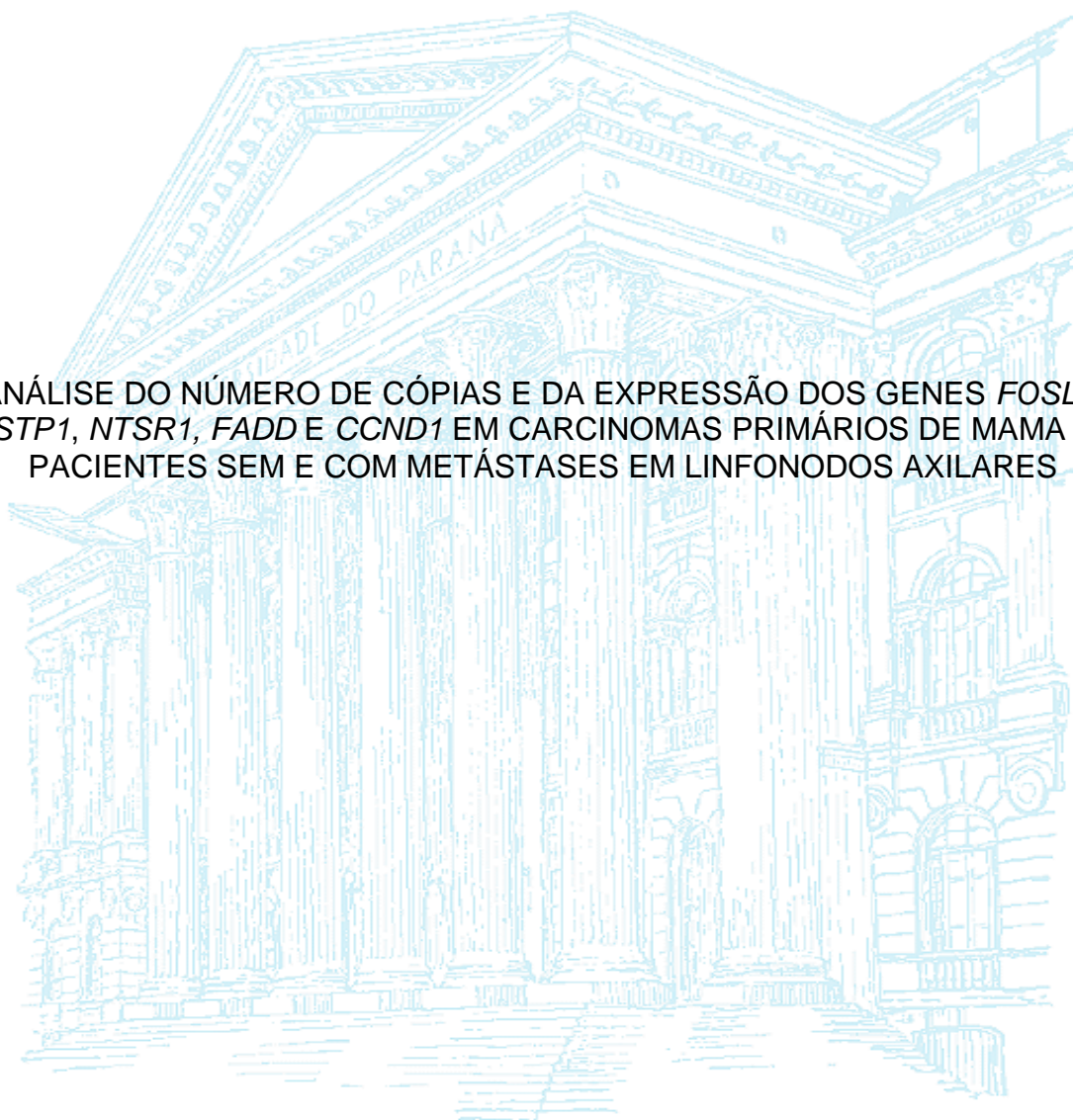


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CÍNTIA CALLEGARI COÊLHO FERNANDES

ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS E DA EXPRESSÃO DOS GENES *FOSL1*,
GSTP1, *NTSR1*, *FADD* E *CCND1* EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA DE
PACIENTES SEM E COM METÁSTASES EM LINFONODOS AXILARES



CURITIBA
2015

CÍNTIA CALLEGARI COÊLHO FERNANDES

**ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS E DA EXPRESSÃO DOS GENES *FOSL1*,
GSTP1, *NTSR1*, *FADD* E *CCND1* EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA SEM
E COM METÁSTASES EM LINFONODOS AXILARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, para
obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: **Prof. Dr. Iglénir João Cavalli**
Co-orientadora: **Prof^a. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro**

Colaboradores: Prof. Dr. Cícero de Andrade Urban
Prof^a. Dra. Luciane Regina Cavalli
Prof. Dr. Rubens Silveira Lima

CURITIBA
2015



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **CÍNTIA CALLEGARI COELHO FERNANDES**, para obtenção do título de Doutora em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se aprove a candidata.

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 24 de setembro de 2015

Iliada Rainha de Souza

Doutora Iliada Rainha de Souza

Universidade Federal de Santa Catarina – Membro Titular

Cicero de Andrade Urban

Doutor Cicero de Andrade Urban

Universidade Positivo – Membro Titular

Valéria Maria Munhoz Sperandio Roxo

Doutora Valéria Maria Munhoz Sperandio Roxo

Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

Danielle M. Ferreira

Doutora Danielle Malheiros Ferreira

Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

Iglenir João Cavalli

Doutor Iglenir João Cavalli

Universidade Federal do Paraná – Orientador e Presidente da Banca

Visto

Lupe Furtado Alle

Professora Doutora Lupe Furtado Alle

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética



Agradecimentos

É difícil a tarefa de dar créditos a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese. Contudo, algumas pessoas se fizeram imprescindíveis, às quais eu sou especialmente grata e com as quais divido todo o mérito que este trabalho merecer. Todo e qualquer equívoco, no entanto, é de minha inteira responsabilidade.

Prof. Dr. Iglénir Cavalli e Prof. Dra. Enilze Ribeiro, que foram exímios orientadores, e que com muito carinho e paciência me guiaram pelos encantos da ciência, pelos percalços do caminho e me ajudaram a produzir este trabalho com calma e confiança.

Os colaboradores Dra. Luciane Cavalli, Dr. Cícero Urban e Dr. Rubens Lima, que participaram de forma essencial para que este trabalho fosse realizado.

Os membros da banca examinadora, Dra. Iliada Rainha de Souza, Dra. Danielle Malheiros, Dra. Valéria Roxo, Dr. Cícero Urban, e Dr. Ricardo Lehtonen, por gentilmente aceitarem o convite para integrar esta banca e garantirem valiosas contribuições a este trabalho.

Meus colegas de laboratório, por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável de onde levarei grandes amigos.

As pacientes participantes que, num momento difícil, entenderam a importância da pesquisa e do trabalho científico para que um dia saibamos lidar melhor com esta triste doença e doaram um pouquinho de si para nossos trabalhos.

CAPES e CNPq pelas bolsas de estudo e pesquisa disponibilizadas para mim e meus orientadores e pelo apoio financeiro ao projeto.

Por fim, um agradecimento muito especial ao Fabiano, que encarou comigo esse desafio e com muito amor me deu força para chegar até o final. Aos meus pais, que me deram todo o suporte e incentivo que eu precisei ao longo desses anos. E, por último mas não menos importante, meu irmão, que mesmo longe sempre me acompanha de perto.

*This is not the end. It is not even the
beginning of the end. But it is, perhaps,
the end of the beginning.*

Winston Churchill

Resumo

As alterações no número de cópias de DNA e na expressão gênica são fatores importantes no câncer de mama. Nosso objetivo foi investigar a possível associação dos genes *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD* e *CCND1*, selecionados a partir de uma análise de CGHarray prévia, no desenvolvimento e na progressão dos tumores, assim como sua possível função como preditores de prognóstico. Com este objetivo, foram selecionadas amostras de pacientes com tumor primário sem (LN-) e com (LN+) metástase nos linfonodos axilares, e usando esse parâmetro como marcador da progressão da doença. O número de cópias de DNA e a expressão do RNAm foram analisadas utilizando ensaios TaqMan® em 137 tumores primários, sendo 53 LN- e 84 LN+. Todos os genes estudados mostraram aumento do número de cópias de DNA (58,07% da amostra total) com ênfase para os genes *NTSR1*, *FADD* e *CCND1*. Com exceção do gene *FADD* no grupo LN+, o nível de RNAm não mostrou dependência do número de cópias de DNA, sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidos na regulação. Em relação aos parâmetros clínicos e histopatológicos (tamanho, grau e estágio do tumor, expressão dos receptores hormonais e evolução clínica), não foi observada associação com as alterações de número de cópias de DNA. Os resultados indicam que o aumento do número de cópias em *NTSR1*, *FADD* e *CCND1* provavelmente esteja envolvido nos estágios iniciais da tumorigênese mamária, uma vez que não foram observadas diferenças ao comparar LN- e LN+.

Palavras-chave: Número de cópias de DNA, expressão gênica, câncer de mama, linfonodos, metástase, *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD*, *CCND1*.

Abstract

Changes in genes copy number and mRNA expression are important factors in breast cancer. We aimed to investigate the possible association of the genes *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD* and *CCND1*, selected after previous array-CGH analysis, in tumor development and progression as well their possible role as prognostic predictors. With this objective, we selected samples from patients with primary tumors without (LN-) or with (LN+) metastasis in lymph nodes, taking this parameter as a marker of disease progression. The DNA copy number and mRNA expression were analyzed using TaqMan® assays in 137 primary breast tumors being 53 LN- and 84 LN+. All genes studied showed an increased copy number (58.07% of the total sample) with emphasis to *NTSR1*, *FADD* and *CCND1*. With the exception of *FADD* in LN+ group, the mRNA level did not show dependency of the copy number, suggesting that other mechanisms can be involved in the regulation. Regarding the histopathological and clinical parameters (tumor size, grade and stage, the hormonal receptors status and clinical evolution) no association with the copy number alterations were observed. The results indicated that the increased copy number in *NTSR1*, *FADD* and *CCND1* is probably involved in the early stages of breast tumorigenesis, since no difference were observed when LN- and LN+ were compared.

Key words: DNA copy number, gene expression, breast cancer, lymph node, metastasis, *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD*, *CCND1*.

Résumé

Les changements dans le nombre de copies des gènes et leurs expressions ARNm sont des facteurs importants pour le cancer du sein. Nous avons cherché l'association possible entre les gènes *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD* et *CCND1*, sélectionnés après l'analyse précédente par puce d'hybridation génomique comparative, dans le développement et la progression tumorale ainsi que leur rôle possible comme facteurs prédictifs pronostiques. Dans ce but, nous avons sélectionné des échantillons provenant de patientes atteintes de tumeurs primaires sans (LN-) ou avec (LN+) métastase dans les ganglions lymphatiques, la prise de ce paramètre comme un marqueur de la progression de la maladie. Le nombre de copies de l'ADN et l'expression de l'ARNm ont été analysés en utilisant des dosages TaqMan sur 137 tumeurs du sein primaires étant 53 LN- et 84 LN+. Tous les gènes étudiés ont montré un nombre accru de copies (58.07% du total de l'échantillon) en mettant l'accent sur *NTSR1*, *FADD* et *CCND1*. À l'exception de *FADD* dans le groupe LN+, le niveau d'ARNm la dépendance du nombre de copies n'a pas été vérifiée, ce qui suggère que d'autres mécanismes peuvent être impliqués dans la régulation. En ce qui concerne les paramètres cliniques et histopathologiques (taille du tumeur, grade et le stade, le statut des récepteurs hormonaux et l'évolution clinique), aucune association entre le nombre de copies n'a été observée. Les résultats ont indiqué que l'augmentation du nombre de copies dans *NTSR1*, *FADD* et *CCND1* est probablement impliqué dans les premières étapes de la tumorigenèse mammaire, étant donné qu'aucune différence n'a été observée lorsque LN- et LN+ ont été comparés.

Mots-clés: nombre de copies de DNA, expression génique, cancer du sein, ganglions lymphatiques, métastases, *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD*, *CCND1*.

Lista de figuras

- FIGURA 1: COMPOSIÇÃO DA PREDISPOSIÇÃO AO CÂNCER DE MAMA. CÂNCER DE MAMA FAMILIAL (À ESQUERDA) CONTRIBUI COM APENAS 5 A 10% DO TOTAL DE CÂNCER DE MAMA (À DIREITA). OS GENES ENVOLVIDOS NO CÂNCER DE MAMA FAMILIAL (*BRCA1* E *BRCA2*) PERFAZEM APROXIMADAMENTE 30% DO TOTAL DE CÂNCER FAMILIAL. A MAIORIA DAS VARIANTES GENÉTICAS QUE CONTRIBUEM PARA O DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER DE MAMA ESPORÁDICO SÃO DESCONHECIDOS. 20
- FIGURA 2: MODELO DE PROGRESSÃO DO CÂNCER DE MAMA. 25
- FIGURA 3: ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS SUBTIPOS DE TUMORES DE MAMA. CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES DE MAMA DE ACORDO COM O *STATUS* DOS RECEPTORES HORMONAIS E DA ONCOPROTEÍNA *ERBB2*. 28
- FIGURA 4: REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA PELO COMPLEXO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO AP-1, FORMADO POR *FOSL1* E *JUN*. 31
- FIGURA 5: EXEMPLO DA CONJUGAÇÃO DA GLUTATIONA COM UM XENOBIÓTICO HIPOTÉTICO EFETUADA PELA *GST*. 33
- FIGURA 6: VIA SIMPLIFICADA PELA QUAL O COMPLEXO NTS/NTSR1 PODE CONTRIBUIR PARA O DESENVOLVIMENTO E A PROGRESSÃO TUMORAL, INFLUENCIANDO A REGULAÇÃO GÊNICA E INDUZINDO MOBILIDADE, PROLIFERAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA CELULAR E INVASIVIDADE. 36
- FIGURA 7: ESQUEMA DA VIA EXTRÍNSECA DA APOPTOSE. 39
- FIGURA 8: A CICLINA D1 INTERAGE COM AS CDK4 OU CDK6 INICIANDO A FOSFORILAÇÃO DOS REPRESSORES DA TRANSCRIÇÃO DA FAMÍLIA DA PRB. COMO RESULTADO, OS FATORES DE TRANSCRIÇÃO E2F SÃO LIBERADOS, PERMITINDO A SÍNTESE DOS GENES DA FASE S DO CICLO CELULAR. ESTA ATIVIDADE DA CICLINA D1 TEM SEU AUGE NO FINAL DA FASE G1 (*). 42

Lista de tabelas

TABELA 1: GENES, LOCALIZAÇÃO DAS SONDAS, TAMANHO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS E FLUORÓFOROS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE NÚMERO DE CÓPIAS DE DNA.	51
TABELA 2: GENES, LOCALIZAÇÃO DAS SONDAS, TAMANHO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS E FLUORÓFOROS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE EXPRESSÃO GÊNICA.	52
TABELA 3: DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES <i>FOSL1</i> , <i>GSTP1</i> , <i>NTSR1</i> , <i>FADD</i> E <i>CCND1</i> NAS PACIENTES LN- E LN+.	55
TABELA 4: NÚMERO DE CÓPIAS E VALORES DE EXPRESSÃO DOS GENES <i>FOSL1</i> , <i>GSTP1</i> , <i>FADD</i> E <i>CCND1</i> DE 18 PACIENTES SEM METÁSTASES NOS LINFONODOS AXILARES, COM AS RESPECTIVAS MÉDIAS E VALORES DOS COEFICIENTES DE REGRESSÃO.	58
TABELA 5: NÚMERO DE CÓPIAS E VALORES DE EXPRESSÃO DOS GENES <i>FOSL1</i> , <i>GSTP1</i> , <i>FADD</i> E <i>CCND1</i> DE 13 PACIENTES COM METÁSTASES EM LINFONODOS AXILARES, COM AS RESPECTIVAS MÉDIAS E VALORES DOS COEFICIENTES DE REGRESSÃO E DAS MÉDIAS E COEFICIENTES DE REGRESSÃO DA SOMATÓRIA DAS AMOSTRAS LN- E LN+.	59
TABELA 6: MÉDIAS DO TAMANHO DO TUMOR (EM CM) DE ACORDO COM AS ALTERAÇÕES DO NÚMERO DE CÓPIAS DE DNA DOS GENES <i>FOSL1</i> , <i>GSTP1</i> , <i>NTSR1</i> , <i>FADD</i> E <i>CCND1</i> NAS AMOSTRAS LN- E LN+.	68
TABELA 7: RESULTADOS DO TESTE DE TUKEY (Δ), INDICANDO AS DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS A 0,05, ENTRE AS MÉDIAS {M+(-)M-} DOS TAMANHOS DOS TUMORES DOS GENES DA AMOSTRA DE PACIENTES LN+ QUANDO COMPARADAS COM AS DE LN-.	68
TABELA 8: DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES <i>FOSL1</i> , <i>GSTP1</i> , <i>NTSR1</i> , <i>FADD</i> E <i>CCND1</i> NOS TUMORES DE GRAUS I, II E III NAS AMOSTRAS DE PACIENTES LN- E LN+.	69
TABELA 9: DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES <i>FOSL1</i> , <i>GSTP1</i> , <i>NTSR1</i> , <i>FADD</i> E <i>CCND1</i> NOS TUMORES DE ESTÁGIOS 1, 2, 3 E 4 NAS AMOSTRAS DE PACIENTES LN- E LN+.	70
TABELA 10: DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES <i>FOSL1</i> , <i>GSTP1</i> , <i>NTSR1</i> , <i>FADD</i> E <i>CCND1</i> NOS TUMORES COM E SEM AMPLIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ERBB2 NAS AMOSTRAS DE PACIENTES LN- E LN+.	71
TABELA 11: DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES <i>FOSL1</i> , <i>GSTP1</i> , <i>NTSR1</i> , <i>FADD</i> E <i>CCND1</i> NOS TUMORES COM E SEM EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO (RE) NAS AMOSTRAS DE PACIENTES LN- E LN+.	72
TABELA 12: DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES <i>FOSL1</i> , <i>GSTP1</i> , <i>NTSR1</i> , <i>FADD</i> E <i>CCND1</i> NOS TUMORES SEM E COM EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE PROGESTERONA (RP) NAS AMOSTRAS DE PACIENTES LN- E LN+.	73

Lista de abreviaturas e siglas

ACS	<i>American Cancer Society</i>
AP-1	Proteína ativadora 1, do inglês <i>activator protein-1</i>
CCND1	Gene ciclina D1
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CGH	Hibridização genômica comparativa, do inglês <i>comparative genomic hybridization</i>
CNA	Alteração do número de cópias, do inglês <i>copy number alteration</i>
CK	Citoqueratina
cr.	cromossomo
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DD	Domínio de morte celular, do inglês <i>death domain</i>
DED	Domínio efector de morte celular, do inglês <i>death effector domain</i>
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte celular, do inglês <i>death inducing signalling complex</i>
dNTP	Desoxinucleotídeo tri-fosfatado
DR3	Receptor de morte celular 3
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal, do inglês <i>epidermal growth factor receptor</i>
EGR1	Proteína 1 de resposta precoce ao crescimento, do inglês <i>early growth response protein 1</i>
ELK1	Proteína Elk-1 com domínio ETS, do inglês <i>ETS domain-containing protein Elk-1</i>
ERBB2	Proteína tirosina cinase Erb-b2, do inglês <i>Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
ERK	Proteína cinase regulada por sinais extracelulares
<i>et al.</i>	E colaboradores, do latim <i>et alli</i>
FADD	Gene Domínio de morte celular associado à Fas, do inglês <i>Fas-associated death domain</i>
FAK	Cinase de adesão focal, do inglês <i>focal adhesion kinase</i>
Fra-1	Antígeno 1 relacionado a Fos, do inglês <i>Fos-related antigen-1</i>
FOSL1	Gene Antígeno 1 relacionado a Fos, do inglês <i>Fos-related antigen-1</i>
GATA3	Fator de transcrição específico de células T, do inglês <i>Trans-acting T-cell-specific transcription factor</i>
GST	Glutathiona-S-transferase
GSTP1	Gene da glutathiona-S-transferase pi 1
HNSCC	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, do inglês <i>head and neck squamous cell carcinoma</i>
IC	Carcinoma invasivo, do inglês <i>invase carcinoma</i>
IDC	Carcinoma intraductal, do inglês <i>intraductal carcinoma</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LN-	pacientes sem metástases nos linfonodos axilares
LN+	pacientes sem metástases nos linfonodos axilares
LNS	Linfonodo sentinela

MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno, do inglês <i>mitogen-activated protein kinases</i>
MBD4	Proteína 4 com domínio de ligação a metil-CpG, do inglês <i>methyl-CpG binding domain protein 4</i>
MIB-1	Anticorpos monoclonais contra Ki67
MLPA	Amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação, do inglês <i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MMP	Metaloproteinase
n	Tamanho amostral
NTSR1	Gene do receptor 1 de alta afinidade à neurotensina, do inglês <i>neurotensin receptor 1</i>
NTS	Neurotensina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PKC	Proteína cinase C, do inglês <i>protein kinase C</i>
qPCR	PCR quantitativa
RAS	Família de oncogenes Ras
RE	Receptor de estrogênio
RHO-GTPase	Família de proteínas G
RIP	Proteína de interação com o receptor, do inglês <i>receptor-interacting protein</i>
RNAi	RNA de interferência
RNA _m	RNA mensageiro
RP	Receptor de progesterona
RR	Risco relativo
RT	Retrotranscrição
rpm	Rotações por minuto
RPPH1	Gene da ribonuclease P, do inglês ribonuclease P RNA component H1
T.E.F.	Teste exato de Fisher
TN	Triplo-negativo
TNF	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumor necrosis factor</i>
TNFR1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumor necrosis factor receptor 1</i>
TRADD	Domínio de morte celular associado a TNFR1, do inglês TNFR1-associated death domain
UC	Última consulta
VCD	Viva com doença
vs.	<i>versus</i>

Lista de símbolos

Mb	megabases
mM	milimolar
µg	microgramas
µl	microlitros
ng	nanogramas
pb	pares de bases

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 O câncer de mama	18
2.1.1 Fatores de risco.....	19
2.1.2 Genética do câncer de mama.....	19
2.1.3 Aspectos clínico-patológicos dos tumores mamários.....	23
2.1.4 Classificação dos tumores mamários.....	25
2.1.4.1 Classificação clínica e histopatológica.....	25
2.1.4.2 Classificação molecular.....	26
2.1.5 Linfonodos axilares	29
2.2 Genes <i>FOSL1</i> , <i>GSTP1</i> , <i>NTSRI</i> , <i>FADD</i> e <i>CCND1</i>	30
2.2.1 <i>FOSL1</i>	30
2.2.2 <i>GSTP1</i>	32
2.2.3 <i>NTSRI</i>	34
2.2.4 <i>FADD</i>	37
2.2.5 <i>CCND1</i>	41
3. JUSTIFICATIVA	46
4. OBJETIVOS	47
4.1 Objetivo geral	47
4.2 Objetivos específicos.....	47
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
5.1 Obtenção e processamento das amostras.....	48
5.2 Caracterização da amostra	49
5.3 Extração do DNA	49
5.4 Análise do número de cópias de DNA	50
5.5 Extração de RNA e retrotranscrição.....	51
5.6 Análise de expressão gênica	52
5.7 Análise estatística	53
6. RESULTADOS	54
6.1 Análise do número de cópias de DNA	54
6.2 Análise da expressão gênica.....	56
6.3 Associação com parâmetros histopatológicos	60
6.3.1 Tamanho do tumor	60
6.3.2 Grau do tumor.....	61
6.3.3 Estágio do tumor.....	62
6.3.4 Amplificação de ERBB2	64
6.3.5 Expressão do receptor de estrogênio	64
6.3.6 Expressão do receptor de progesterona	65
6.3.7 Evolução clínica	66
7. DISCUSSÃO.....	74
8. CONCLUSÃO.....	85
Referências	86
Apêndices	97

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia mais comum e a principal causa de morbidade e mortalidade entre as mulheres no mundo. No Brasil, dados de registros de câncer do Ministério da Saúde indicam o câncer de mama como a segunda neoplasia maligna mais frequente e a principal causa de mortalidade na população feminina, com estimativas de ocorrência de 57 mil novos casos de câncer de mama para o biênio 2014/2015, representando um importante problema de saúde no país (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2014).

Nas últimas duas décadas, diversos estudos foram realizados com o objetivo de identificar alterações genéticas que possam ser utilizadas como marcadores no câncer de mama, entretanto, com poucas exceções, como é o caso do ERBB2, que é utilizado na clínica com sucesso, poucos biomarcadores efetivos foram identificados. Ainda hoje, o principal biomarcador recomendado e rotineiramente utilizado é a presença dos receptores de estrógeno e de progesterona, que permite a seleção de pacientes com potencial para responderem à terapia endócrina.

Atualmente as duas principais áreas de investigação em câncer de mama são a descoberta de novos biomarcadores para o diagnóstico precoce e o prognóstico da doença e o entendimento das diferentes vias de sinalização intracelular associadas à iniciação e progressão do câncer de mama que possam permitir a identificação de novos alvos terapêuticos e novas estratégias para o tratamento das pacientes com câncer de mama.

A linha de pesquisa sobre estudos genéticos em neoplasias humanas iniciou-se no Laboratório de Citogenética Humana (atualmente Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná há cerca de 25 anos. Na década dos anos 90, o objetivo principal era a análise, através da citogenética clássica, das alterações cromossômicas em tumores de tecidos sólidos, mais especificamente em neoplasias mamárias. Pretendia-se não só identificar as aberrações cromossômicas presentes nestes tumores, mas também regiões cromossômicas potencialmente portadoras de genes (proto-oncogenes, genes supressores de tumor e outros genes) envolvidos na

etiologia e progressão tumoral. A partir do início da década de 2000 a mesma linha de pesquisa tem sido desenvolvida com a utilização de metodologias moleculares.

Neste contexto, TORRESAN (2011), do nosso grupo de pesquisa, considerando a importância clínica da análise do linfonodo sentinela na predição de metástases axilares mamárias e que não há marcadores genéticos capazes de informar sobre a presença ou ausência de metástases no referido linfonodo, desenvolveu um trabalho que teve como objetivo principal identificar a presença de alterações do número de cópias de DNA em diferentes regiões do genoma humano em metástases nos linfonodos sentinela em comparação com os tumores primários correspondentes, utilizando os métodos de CGH e CGH-array. As principais conclusões resultantes do referido trabalho são descritas a seguir:

Alterações de número de cópias de DNA estão presentes nas metástases mamárias do linfonodo sentinela. Ganhos ou amplificações de regiões cromossômicas foram mais frequentes do que as perdas ou deleções, em ambas amostras tumorais.

Alterações cromossômicas compartilhadas foram observadas em 26 (86,7%) dos 30 casos analisados por CGH onde observou-se que das 556 alterações detectadas, 132 (23,7%) eram compartilhadas e das 25 (18,9%), mais frequentes, 20 (80%) estavam presentes tanto no tumor primário como nas metástases do linfonodo sentinela. A análise por CGH-array foi realizada em 10 casos pareados dos quais 5 (50%) apresentaram alterações cromossômicas compartilhadas. Nesta análise foram detectadas 188 alterações cromossômicas, das quais 28 (14,9%) eram compartilhadas. Destas, 10 (35,7%) foram mais frequentes, das quais 9 (90%) estavam presentes tanto no tumor primário como nas metástases do linfonodo sentinela.

A maior frequência de alterações cromossômicas observadas entre os casos, ou entre as amostras tumorais de um mesmo caso, foi de alterações não-compartilhadas (ou isoladas). Este resultado é esperado, e reflete a alta heterogeneidade genética que é característica das células tumorais mamárias, sugerindo uma possível divergência clonal em estágios iniciais da progressão tumoral, determinando a evolução independente dos clones celulares de tumores primários e de lesões metastáticas.

No entanto, as alterações mais frequentemente detectadas foram comuns a ambas as lesões analisadas e devem ser consideradas para a identificação de marcadores moleculares potencialmente capazes de informar sobre o prognóstico metastático de um tumor primário,

admitindo-se que a metastatização é um evento que já pode ser determinado geneticamente no tumor primário.

Nas regiões cromossômicas alteradas nos casos analisados no presente estudo estão mapeados genes envolvidos na proliferação e/ou diferenciação da célula mamária, que atuam principalmente nos processos biológicos de regulação da transcrição do DNA e da proliferação celular, transdução de sinal, apoptose, resposta ao estresse e a danos, reparo do DNA e regulação do ciclo celular.

(TORRESAN, 2011)

A partir do trabalho acima citado, bioinformatas da Universidade de Georgetown, Washington, DC, EUA, identificou, nas regiões com maior frequência de alterações cromossômicas compartilhadas, cinco genes com potencial envolvimento na carcinogênese mamária, que foram então selecionados para este trabalho.

Os genes *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD* e *CCND1* foram estudados em nível gênico através de dois métodos, a análise de número de cópias de DNA e a análise da expressão gênica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O câncer de mama

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e é o mais frequente em mulheres, excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma. Representa uma das principais causas de morte em mulheres nos países ocidentais, mesmo com os avanços no estadiamento e nos tratamentos quimio/radioterápicos e cirúrgicos (ABDUL-RASOOL *et al.*, 2006). No Brasil, a cada ano, cerca de 28% dos novos casos de câncer são de mama (INCA, 2014).

Fatores como a idade, paridade e nível de desenvolvimento do país interferem na sua distribuição geográfica. Nos anos 80 e 90, a incidência de câncer de mama nos Estados Unidos, por exemplo, foi mais expressiva do que a dos anos anteriores, embora isso não deva representar um aumento real, mas devido a melhores procedimentos diagnósticos como a mamografia. No entanto, estes procedimentos não resultaram numa redução substancial da mortalidade, provavelmente devido aos melhores registros epidemiológicos, e a redução na taxa de mortalidade, mesmo não substancial, que pode ser atribuída à detecção precoce e à redução dos tratamentos de reposição hormonal (AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS), 2011).

Dos 302 mil novos casos de câncer previstos para 2014 e 2015 no Brasil, o de mama é o mais incidente na população feminina, estimando-se 57.120 novos casos. A incidência desta enfermidade está em torno de 56 casos a cada 100.000 mulheres e a sobrevida média após cinco anos é de 85% em países desenvolvidos e de 60% nos países em desenvolvimento (INCA, 2014).

No Estado do Paraná a incidência do câncer de mama é maior, 61,74 casos a cada 100.000 mulheres (3.490 novos casos/ano). Considerando-se somente a capital do Estado, Curitiba, a taxa de incidência aumenta para 92,47 casos a cada 100.000 mulheres com um número aproximado de 910 novos casos/ano (INCA, 2014). Neste contexto, fica evidente que a caracterização dos fatores de risco

presentes nas diferentes populações humanas é fundamental para o delineamento de estratégias de prevenção do câncer de mama.

2.1.1 Fatores de risco

Estudos epidemiológicos indicam alguns fatores de risco endógenos e exógenos que podem conferir suscetibilidade para o desenvolvimento de câncer de mama como: fatores reprodutivos e hormonais (menarca precoce - antes dos 11 anos de idade, menopausa tardia - em média, depois dos 50 anos de idade, nuliparidade e idade da primeira gestação acima dos 30 anos). O risco é elevado devido às altas taxas de estrogênio endógeno. Outros fatores devem ser considerados: exposição à radiação ionizante antes dos 35 anos de idade, exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, tabagismo, alcoolismo, consumo de carne vermelha e industrializada (bacon, hambúrguer, salsicha), obesidade ou alta densidade óssea após a menopausa, doença proliferativa benigna da mama e história familiar de câncer (ZHENG *et al.*, 1999; GERGER *et al.*, 2007; ACS, 2011). O uso de contraceptivos orais e a terapia de reposição hormonal continuam controversos (COLLINS, BLAKE e CROSIGNANI, 2005).

Os fatores ambientais são responsáveis pela maioria dos casos de câncer e a lesão do DNA está consistentemente associada ao risco do desenvolvimento de neoplasias (SMITH *et al.*, 2003; CRESPI e SUMMERS, 2005; CEBRIAN *et al.*, 2006). No entanto, os fatores de risco identificados explicam apenas um terço dos casos da doença (KHABAZ, 2014).

2.1.2 Genética do câncer de mama

Nas últimas décadas, diversas evidências indicaram a natureza genética do câncer, determinado pelo acúmulo de mutações (herdadas ou adquiridas) no genoma. A maioria das neoplasias resulta da interação de fatores genéticos e ambientais. O câncer hereditário é responsável por aproximadamente 5-10% de

todos os casos, os demais são atribuídos a causas externas, ou seja, fatores ambientais que atuam em conjunto com a predisposição genética e a adquirida (MENKO *et al.*, 2007; KHABAZ, 2014). O estabelecimento de políticas públicas para a prevenção do câncer deve considerar a variabilidade individual na predisposição ao câncer, que é decorrente de fatores genéticos, étnicos, nutricionais e ambientais.

A etiologia do câncer de mama é extremamente complexa. Estudos de ligação gênica em famílias afetadas resultaram na identificação de dois genes de alta penetrância, *BRCA1* e *BRCA2* (WOOSTER *et al.*, 1995; NASS *et al.*, 2000). Mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* aumentam o risco de câncer de mama e ovário e são responsáveis por cerca de 30% dos casos hereditários (Figura 1) que representam apenas 5 a 10% de todos os casos de câncer de mama (DUNNING *et al.*, 1999; KUSCHEL *et al.*, 2002; LANGSENLEHNER *et al.* 2003; PHAROAH *et al.*, 2007). No entanto, cerca de 30% de mulheres jovens que desenvolvem câncer de mama devem apresentar um padrão genético de predisposição à doença (DUFLOTH *et al.*, 2005).

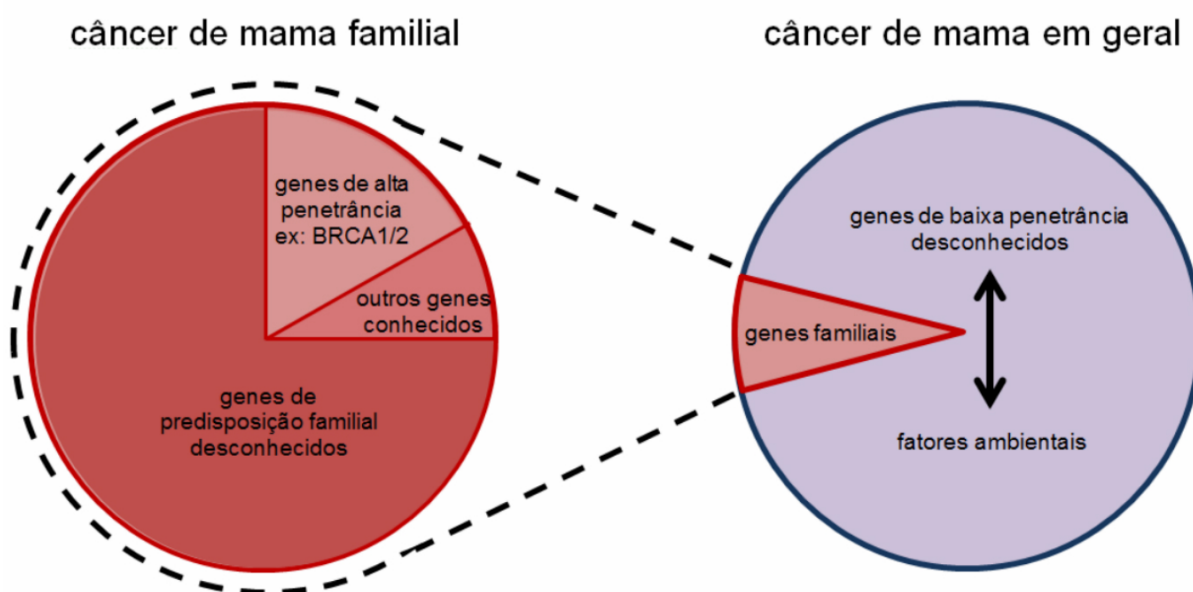


Figura 1: Composição da predisposição ao câncer de mama. Câncer de mama familiar (à esquerda) contribui com apenas 5 a 10% do total de câncer de mama (à direita). Os genes envolvidos no câncer de mama familiar (*BRCA1* e *BRCA2*) perfazem aproximadamente 30% do total de câncer familiar. A maioria das variantes genéticas que contribuem para o desenvolvimento de câncer de mama esporádico são desconhecidos. Adaptado de BALMAIN, GRAY e PONDER, 2003.

Sendo assim, outros genes que causam predisposição ao câncer de mama estão envolvidos (GERGER *et al.*, 2007). A investigação destes genes é de extrema

importância, pois codificam proteínas que participam em vários processos que atuam de forma importante na carcinogênese, como o controle do ciclo celular, a metabolização de xenobióticos, a entrada de hormônios nas células e o reparo e metilação do material genômico.

A manifestação e o comportamento das células são determinados pelos genes expressos por elas. O comportamento anormal das células cancerosas pode, então, ser explicado por modificações no conjunto de genes que estão ativos nestas células e pela perda do controle sobre as células, que se multiplicam rapidamente tanto por fatores genéticos quanto ambientais (KHABAZ, 2014).

As principais anormalidades genéticas observadas no câncer incluem a expressão aumentada de oncogenes, inativação de genes supressores de tumor, instabilidades cromossômicas, alterações nos genes de reparo do DNA, reativação da telomerase, alterações epigenéticas e amplificações de regiões específicas do genoma. Sendo estas alterações possíveis modificadores do comportamento das células tumorais, é importante identificar os genes onde ocorrem estas anormalidades (FEARON e VOGELSTEIN, 1990; GILLET *et al.*, 1994; KHABAZ, 2014).

Os proto-oncogenes são genes altamente conservados na evolução das espécies e seus produtos são reguladores importantes do crescimento e diferenciação celular em todos os organismos eucariotos. Estão localizados em diversos sítios do DNA e seus produtos regulam a cascata de eventos que mantém a progressão ordenada do ciclo celular, divisão e diferenciação celular. Essa cascata de eventos ativa uma cadeia intracelular de sinais bioquímicos que resulta na ativação e repressão alternada de diversos genes (LOURO *et al.*, 2002). Quando mutado, um proto-oncogene se transforma em um oncogene, ocorrendo a perda do seu controle normal na regulação do crescimento, o que contribui para a proliferação aumentada de certos produtos proteicos e desregulação da divisão celular (SUGIMURA, 1998).

Uma grande parte dos oncogenes codifica fatores de transcrição cuja expressão desregulada ou ativação, assim como mutações e translocações são importantes na tumorigênese. A maioria das vias de sinalização oncogênicas convergem para conjuntos de fatores de transcrição que controlam o padrão de expressão gênica da célula, resultando em desenvolvimento tumoral, progressão e metástase (LUO *et al.*, 2010).

Os genes supressores de tumor, por sua vez, atuam como reguladores negativos da proliferação celular, retardando a progressão do ciclo e assim bloqueando a diferenciação ou induzindo a morte programada por apoptose. Alterações que inativam estes genes liberam a célula da inibição regulada pelos mesmos em determinadas fases do ciclo celular (pontos de checagem), resultando na proliferação desordenada, característica da célula cancerosa (WEINBERG, 1991). Alterações nos genes supressores de tumor determinam a perda de função e são consideradas recessivas no nível celular, uma vez que a função destes genes somente é perdida quando ambos os alelos são inativados (BIËCHE *et al.*, 1993).

De acordo com a hipótese de Knudson (1971), dois eventos mutacionais são necessários para a inativação de um gene supressor de tumor. No caso dos cânceres hereditários, a primeira mutação é transmitida pela linhagem germinativa e a segunda é somática. No caso dos cânceres esporádicos as duas mutações acontecem no tecido somático como eventos independentes.

As alterações epigenéticas representam um mecanismo importante no desenvolvimento de vários tipos de câncer por alterar a expressão de genes críticos, podendo resultar na expressão aumentada de oncogenes e/ou na inativação de genes supressores de tumor (RODENHISER e MANN, 2006; BRANHAM *et al.*, 2012). Estas alterações compreendem mudanças na estrutura da cromatina que influenciam a expressão gênica e podem ocorrer por dois mecanismos principais: metilação do DNA e acetilação de histonas. A epigenômica dos tumores é caracterizada por hipometilação global do DNA e hipermetilação específica de alguns genes, que podem ser fatores importantes na carcinogênese mamária e potenciais alvos terapêuticos para prevenção e tratamento devido à possibilidade de reversão dos fenômenos descritos (BRANHAM *et al.*, 2012).

As alterações de número de cópias são comuns no câncer, podendo determinar alterações da expressão e da função de genes localizados na região alterada do genoma. Apesar de variantes estruturais em algumas regiões do genoma não terem uma consequência fenotípica óbvia, outras influenciam a dosagem gênica (FEUK *et al.*, 2006), portanto, a identificação de regiões com alterações de número de cópias e especialmente os genes envolvidos oferece a base para o melhor entendimento do desenvolvimento do câncer, e mais importante, deve fornecer melhores recursos para o manejo clínico do câncer, como novos alvos diagnósticos e terapêuticos (KALLIONIEMI, 2008).

As evidências sugerem que as alterações na dosagem gênica contribuem para a tumorigênese ao alterar os níveis de expressão de genes relacionados ao câncer. Através de análises de alta resolução de alterações de número de cópias em 3.131 amostras de tumor de 26 tipos histológicos diferentes, Beroukhim *et al.* (2010) observaram 75.700 ganhos e 55.101 perdas de número de cópias, com uma média de aproximadamente 24 ganhos e 18 perdas por amostra. Em média, 17% do genoma encontrou-se amplificado e 16% deletado, comparado com uma média de 0,35% e menos de 0,1% em amostras normais (que representa CNAs germinativos e ocasionais artefatos da análise).

Para caracterizar a instabilidade genômica, tem sido utilizada a hibridização genômica comparativa convencional (CGH) para identificar diversos desequilíbrios cromossômicos em uma amostra de um experimento. No entanto, a resolução do CGH convencional é insuficiente para a identificação precisa de alterações submicroscópicas, sendo necessárias análises mais detalhadas com técnicas de alta definição. A combinação de CGH convencional de CGH em microarranjos (CGH array) e qPCR permitiu a análise de alta definição de número de cópias de DNA em todo o genoma (KIM *et al.*, 2006a; KALLIONIEMI, 2008).

2.1.3 Aspectos clínico-patológicos dos tumores mamários

A mama é constituída pelo parênquima e pelo estroma mamário, formado por tecido conjuntivo, colágeno e tecido adiposo, que tem a função de sustentação da mama. O parênquima apresenta a porção secretora (ácinos ou alvéolos), com 15 a 20 lobos mamários, cada um dos quais com um número variável de pequenos lóbulos. Estes apresentam uma rede de ductos e de pequenos alvéolos, revestidos internamente por células luminas glandulares, e externamente por uma camada de células mioepiteliais basais (BIRNBAUM *et al.*, 2004).

As células luminas são responsáveis pela síntese e transporte do leite, enquanto que as células mioepiteliais formam os elementos contrácteis que permitem a ejeção do leite. Em menor número, estão presentes, predominantemente nos ductos, células tronco epiteliais mamárias, capazes de originar células luminas e mioepiteliais e formar novas estruturas durante o desenvolvimento da mama

(STINGL e CALDAS, 2007). Possivelmente, essas células tronco bipotentes originam as neoplasias, podendo seguir duas vias: a luminal-glandular que dá origem aos tumores de subtipo luminal, e a mioepitelial que dá origem aos tumores de subtipo basal (VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007).

Os diferentes tipos celulares e a porção estromal formam o microambiente mamário, controlado por um complexo sistema de fatores incluindo hormônios, que atuam através de seus receptores. As respostas aos estímulos hormonais produzem as vias de sinalização que são responsáveis pela regulação e estimulação celular do tecido mamário (COURTILLOT *et al.*, 2005). Um desequilíbrio nesse microambiente pode resultar em anomalias no desenvolvimento da glândula, doenças inflamatórias, alterações fibrocísticas ou neoplasias malignas (VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007).

Em geral, nas neoplasias mamárias, a proliferação celular desordenada se inicia em células de revestimento dos ductos e lóbulos mamários, sendo os carcinomas correspondentes denominados de ductais e lobulares, respectivamente. Outras doenças da mama ocorrem em outros tipos celulares menos comuns e causam os carcinomas do tipo mucinoso, inflamatório, medular, tubular, papilar e filoide (GUIMARÃES, 2008).

As primeiras lesões aparentes do tumor constituem as hiperplasias, onde as células epiteliais apresentam alterações morfológicas (no entanto, sem atipia citológica) e podem apresentar alterações genéticas (Figura 2). Com a progressão da doença para a forma de carcinoma *in situ*, a atipia citológica torna-se evidente, com aumento significativo no índice mitótico e nas alterações genéticas. Os carcinomas *in situ* são caracterizados por apresentarem proliferação de células que permanecem restritas aos ductos ou lóbulos mamários. Os carcinomas ductais *in situ* (CDIS) podem ser subclassificados seguindo padrões histomorfológicos do tecido, com os tipos mais frequentes designados comedo, cribiforme, micropapilar, papilar e sólido (BATEMAN, 2007).

O CDIS apresenta uma incidência de cerca de 23% nos tumores de mama, enquanto os carcinomas lobulares *in situ* ocorrem em aproximadamente 3% das pacientes. Os carcinomas ductais invasivos compreendem 65 a 80% dos casos de câncer de mama, enquanto que os carcinomas lobulares invasivos são observados em cerca de 10% de todos os carcinomas de mama diagnosticados (EHEMAN *et al.*, 2009, SANDHU *et al.*, 2010).

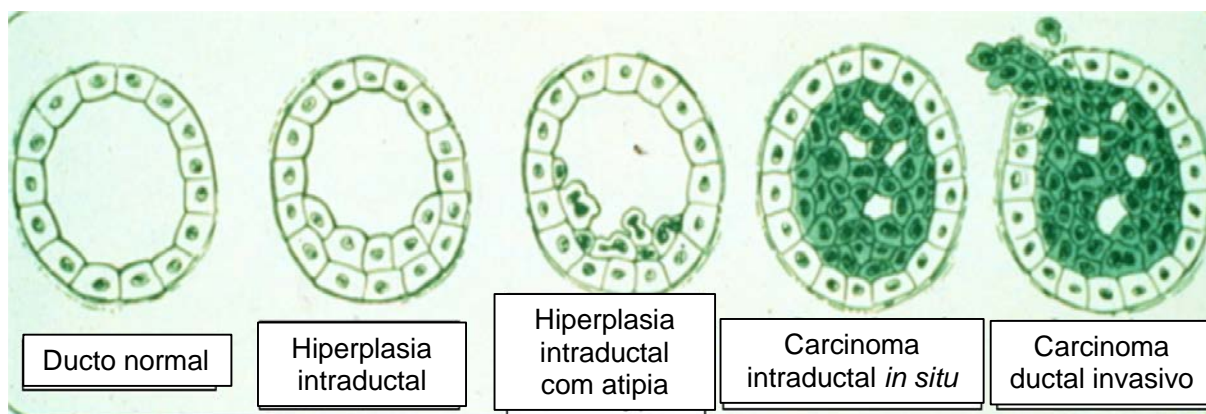


Figura 2: Modelo de progressão do câncer de mama. Adaptado de: <http://sphweb.bumc.bu.edu>.

2.1.4 Classificação dos tumores mamários

2.1.4.1 Classificação clínica e histopatológica

Esta classificação segue padrões estabelecidos pela União Internacional de Combate ao Câncer (UICC, 2002) e baseia-se, em geral, na extensão anatômica da doença, que é determinada clínica e histologicamente. Os tumores mamários são classificados pelo sistema TNM, desenvolvido por Pierre Denoix (França), entre os anos de 1943 e 1952 e aperfeiçoado e atualizado nos anos seguintes (INCA, 2004).

A prática de se dividir os casos de câncer em grupos, de acordo com os chamados estádios, surgiu do fato de que as taxas de sobrevivência eram maiores para os casos nos quais a doença era localizada do que para aqueles nos quais a doença tinha se estendido além do órgão de origem (INCA, 2004).

O sistema TNM tem por base a avaliação de três componentes para descrever a extensão anatômica da doença: T se refere à extensão do tumor primário, N à ausência ou presença de metástase em linfonodos regionais, e M à ausência ou presença de metástase à distância (INCA, 2004).

Além do sistema TNM, o grau de diferenciação histológica classifica os tumores mamários invasivos em três categorias, considerando três características

morfológicas principais (formação tubular, pleomorfismo nuclear e atividade mitótica), e indica o potencial de malignidade: grau I (baixo) – bem diferenciado e com melhor prognóstico; grau II (intermediário) – moderadamente diferenciado; e grau III (alto) – pouco diferenciado e com pior prognóstico (ELSTON e ELLIS, 1991).

Na classificação clínica e histopatológica também são considerados outros fatores clínico-histopatológicos, como idade da paciente, tamanho do tumor, receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) e *status* de ERBB2.

Em conjunto, estes fatores têm sido utilizados na prática clínica para classificar as pacientes em categorias de risco atualmente aceitas, entre elas as diretrizes da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) (LANDERCASPER, DIETRICH e JOHNSON, 2006), as recomendações do consenso de St. Gallen (GOLDHIRSCH *et al.*, 2007) e o prognóstico *Nottingham* (LUNDIN, 2007). No entanto, a heterogeneidade dos tumores de mama e a baixa sensibilidade de alguns dos parâmetros convencionais limitam a capacidade de distinguir diferenças fenotípicas que podem apresentar importantes implicações terapêuticas.

2.1.4.2 Classificação molecular

Os estudos de expressão gênica realizados através das técnicas de microarranjos demonstraram que os padrões de expressão gênica podem redefinir a classificação “tradicional” dos tumores de mama em diferentes subtipos. A partir deles foram traçadas assinaturas de genes com significado prognóstico que permitem o redirecionamento e personalização de terapias (REIS-FILHO e PUSZTAI, 2011).

A diversidade de expressão gênica de tumores mamários pode estar associada com a sua diversidade fenotípica. O trabalho pioneiro de Perou *et al.* (2000) estabeleceu a base para a atual classificação molecular ao analisar tumores mamários de 42 indivíduos, sendo 36 de carcinomas ductais invasivos, dois carcinomas lobulares, um carcinoma ductal *in situ* (CDIS), um fibroadenoma e três amostras de tecido mamário normal. Os tumores foram classificados em quatro subtipos moleculares de acordo com o perfil de expressão de 1.753 genes: luminal, semelhante ao normal (*normal-like*), ERBB2 e basal. Subsequentemente o mesmo

grupo subdividiu o subtipo luminal em pelo menos outros dois subgrupos (luminal A e B) (Figura 3) (PEROU *et al.*, 2000; REIS-FILHO *et al.*, 2006; SORLIE *et al.*, 2006; MARCHIÒ *et al.*, 2008)

As principais características dos cinco subtipos moleculares são:

Tumores RE positivos:

Tumores luminais: Possuem perfil semelhante ao das células luminais do epitélio mamário normal. Expressam citoqueratinas (CKs) de baixo peso molecular incluindo CK7, CK8, CK18 e CK19 e moléculas de adesão celular epitelial (RAKHA, REIS-FILHO e ELLIS, 2008). Este subtipo foi dividido em luminal A e B por apresentarem expressão gênica distinta e diferentes comportamentos clínicos. Os tumores luminais A apresentam alta expressão de RE e genes relacionados a este receptor não possuem amplificação do gene *ERBB2*, assim como apresentam baixa expressão de genes envolvidos na proliferação celular, enquanto os tumores luminais B apresentam alta expressão de genes relacionados ao ciclo celular e proliferação e expressam a proteína ERBB2 (SORLIE *et al.*, 2001; MARCHIÒ e REIS-FILHO, 2008). Quando comparados ao grupo Luminal A, o fenótipo é mais agressivo, apresenta maior grau histológico e taxa de sobrevida menor (HARRIS *et al.*, 2007; BURSTEIN *et al.*, 2010; OLSZEWSKI, CHMIELIK e RYS, 2011; GOLDBIRSCH *et al.*, 2011; ALIZART *et al.*, 2012).

Tumores *normal-like*: O perfil de expressão gênica é similar ao do parênquima mamário normal e dos fibroadenomas e apresentam prognóstico intermediário entre o subtipo luminal e basal. Os carcinomas lobulares invasores podem apresentar este perfil (MARCHIÒ e REIS-FILHO, 2008, EROLES *et al.*, 2012).

Tumores RE negativos:

Tumores ERBB2 positivos: São caracterizados pela alta expressão de genes relacionados à amplificação do *ERBB2*, assim como a proliferação celular e negatividade para RE e RP (MARCHIÒ e REIS-FILHO, 2008). Apresentam também mutações no gene *TP53* em aproximadamente 40% das pacientes e são tumores de prognóstico desfavorável (HARRIS *et al.*, 2007; OLSZEWSKI, CHMIELIK e RYS,

2011; GOLDHIRSCH *et al.*, 2011; REIS-FILHO e PUSZTAI, 2011; ALIZART *et al.*, 2012; EROLES *et al.*, 2012).

Tumores de fenótipo basal: São caracterizados pela presença de células mioepiteliais que expressam CK5/6, CK14, CK17, vimentina, laminina, EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal, do inglês *epidermal growth factor receptor*), possuem alta taxa proliferativa, medida principalmente pela expressão da proteína Ki67, um marcador de proliferação celular. Este subgrupo normalmente apresenta perda das citoqueratinas observadas no subgrupo luminal e frequentemente apresenta perda de RE, RP e ERBB2 (KIM *et al.*, 2006b; LOI, 2008; RAKHA e ELLIS, 2009).

Os tumores basais possuem o maior grau de heterogeneidade molecular dentre os demais subgrupos, com prognóstico clínico desfavorável, frequentemente apresentam alto grau histológico e associações com mutações nos genes *BRCA1* e *TP53* (SEAL e CHIA, 2010).

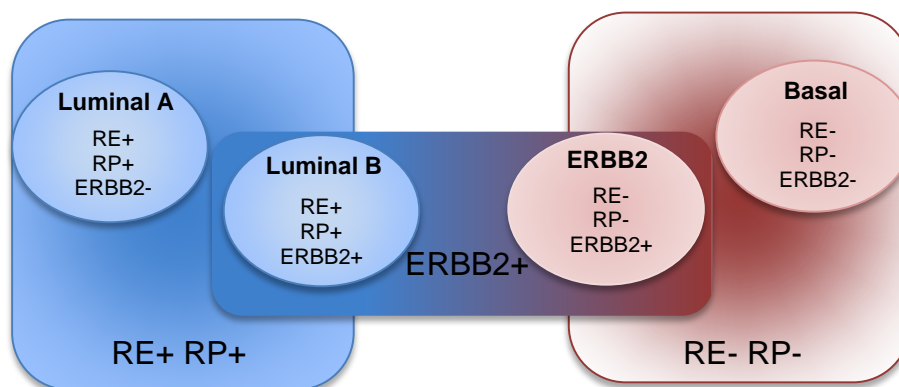


Figura 3: Ilustração esquemática dos subtipos de tumores de mama. Classificação dos tumores de mama de acordo com o *status* dos receptores hormonais e da oncoproteína ERBB2. Adaptado de SANDHU *et al.*, 2010.

Dois novos subtipos tumorais foram incluídos na classificação molecular: claudina baixa e apócrino molecular.

Tumores claudina baixa: Caracterizam-se pela baixa expressão das claudinas (proteínas de junção intercelular) 3, 4 e 7 e E-caderina, uma glicoproteína de adesão celular dependente de cálcio. Além disso, apresentam perda de características comuns das células epiteliais e muitas características das denominadas células tronco iniciadoras de tumor. Comparado aos demais subgrupos, os tumores claudina baixa demonstram baixa expressão de ERBB2 e

marcadores luminais (RE, RP, GATA3, CK18 e CK19), e cerca de 61 a 71% apresentam fenótipo triplo negativo.

Tumores apócrino molecular: São tumores RE-negativos, receptor de androgênio-positivos e que compartilham algumas características com o grupo ERBB2. Possuem alta frequência de amplificação do gene *ERBB2* e características apócrinas em exame histológico, porém apresentam-se como um grupo que possui sua própria assinatura gênica (FARMER *et al.*, 2005).

Os estudos de expressão gênica acima referidos têm fornecido novas perspectivas na clínica e na pesquisa do câncer de mama, revelando a notável complexidade e heterogeneidade genética entre os tumores mamários (REIS-FILHO e PUSZTAI, 2011).

2.1.5 Linfonodos axilares

Os linfonodos axilares são o sítio principal de metástases de tumores mamários (VERONESI *et al.*, 1997). A sua análise se faz importante uma vez que a presença de metástases nos linfonodos é o preditor de sobrevida mais eficaz no câncer de mama, pois diminui a sobrevida de 5 anos em aproximadamente 40% comparado a pacientes com linfonodos não comprometidos (REINTGEN, GIULIANO e COX, 2000).

O *status* dos linfonodos sobressai às variáveis baseadas na importância prognóstica do tumor primário. Existem mais de 30 fatores prognósticos baseados no tumor primário (tamanho do tumor, RE, RP, ploidia, etc), no entanto, análises de regressão múltipla demonstram que essas variáveis contribuem muito pouco ao modelo prognóstico quando o *status* dos linfonodos é considerado (VERONESI *et al.*, 1997; REINTGEN, GIULIANO e COX, 2000).

A dissecação axilar completa, ou esvaziamento axilar completo, determina um prognóstico eficaz e é um método confiável de controle de recorrência (com taxas que variam de 0,5% a 3%), tanto em pacientes linfonodo-positivos como em pacientes linfonodo-negativos (RECHT *et al.*, 1991; AZELSSON *et al.*, 1992 citados por SAKORAFAS, TSIOTOU e BALSIGER, 2000; WRIGHT *et al.*, 2003). Além disto, através deste procedimento é determinada a escolha do tratamento específico para

cada paciente (SAKORAFAS, TSIOTOU e BALSIGER, 2000), o que resulta em uma melhora potencial do tempo de sobrevida (VERONESI, 1997; ORR, 1999).

O linfonodo sentinela (LNS) é o primeiro linfonodo da cadeia linfática axilar e, portanto, o primeiro a apresentar células malignas nos cânceres de mama com metástase. A positividade deste linfonodo é informativa sobre o estado dos demais linfonodos axilares (VERONESI *et al.*, 2003). É identificado por um corante vital e analisado patologicamente e se esta análise revelar a ausência de células tumorais ou metástases, pode se assumir que não existam metástases nos demais linfonodos, que se situam mais distantes, indicando que o tumor mamário está possivelmente limitado ao seu sítio primário. A presença de metástases no LNS sugere o comprometimento dos outros linfonodos axilares e, portanto, é indicado o procedimento de dissecação axilar completa (VERONESI *et al.*, 2001).

2.2 Genes *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD* e *CCND1*

Os genes-alvo deste estudo foram elencados, conforme já nos referimos, a partir de outro trabalho do nosso grupo de pesquisa, desenvolvido por Torresan (2011), que identificou alteração de número de cópias em algumas regiões cromossômicas, especialmente em 11q13 e 20q13. Nestas regiões, verificou-se a existência de cinco genes com possível participação no desenvolvimento e na progressão da carcinogênese mamária, os quais foram selecionados para serem estudados neste trabalho.

2.2.1 *FOSL1*

O gene antígeno 1 FOS-like (*FOSL1*), também conhecido como *FRA1*, está localizado em 11q13.1. A família gênica *FOS* codifica proteínas em zíper de leucina que podem formar dímeros com proteínas da família JUN, formando o complexo do fator de transcrição AP-1 (*activator protein-1*) (Figura 4) (DEBINSKI e GIBO, 2005).

Assim, as proteínas FOS são reguladoras da proliferação, diferenciação e transformação celular (STINSON, 2001).

AP-1 são fatores de transcrição bZIP que pertencem a duas famílias de proteínas: Jun e Fos. Em células de mamíferos, foram identificados três membros da família Jun (c-Jun, JunB e JunD) e quatro da família Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 e Fra-2). Além disso, devido ao processamento alternativo, um mutante dominante negativo de FosB, FosB2, pode ocorrer naturalmente. Essas proteínas formam Jun-Jun homodímeros e heterodímeros Fos-Jun mais estáveis, e ativam a transcrição de acentuadores que contenham TRE. AP-1 tem um papel importante na reprogramação do padrão de expressão gênica em resposta a estímulos externos. Como é um evento tardio em várias cascatas de transdução de sinal, a sua ativação deve ter participação em processos fundamentais que ocorrem nas células de mamíferos, como diferenciação e proliferação celular, transformação oncogênica e apoptose (KUSTIKOVA *et al.*, 1998).

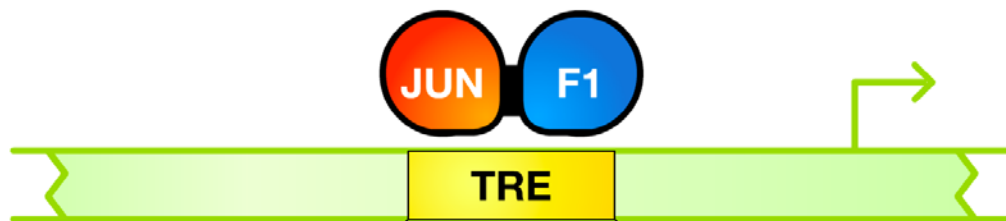


Figura 4: Regulação da expressão gênica pelo complexo do fator de transcrição AP-1, formado por FOSL1 e JUN. Modificado de VAZ e REDDY, 2009.

A família de fatores de transcrição AP-1 inclui os fatores de transcrição Fra-1 e c-Jun como componentes principais. A superexpressão de Fra-1 é um mecanismo comum da ativação constitutiva de AP-1 em tumores, de importância na transformação de diversos tipos celulares mediada por AP-1 (LUO *et al.*, 2010).

Todos os membros da família Fos contêm domínios de zíper de leucina conservados, que permitem a heterodimerização com proteínas Jun, cujos complexos se ligam aos elementos responsivos acetato de tetradecanoilforbol (TPA). Os domínios terminais NH₂- e COOH- das proteínas Fos são muito menos homólogos aos mesmos domínios de outros fatores AP-1, apesar do seu domínio zíper de leucina. As regiões COOH-terminais de c-Fos e FosB exercem função de transativação, que é ausente nas proteínas Fra-1 e Fra-2. Há ainda outra região de transativação nos domínios NH₂-terminais de c-Fos e FosB, que, assim como os

domínios COOH-terminais, é completamente ausente nas proteínas Fra-1 e Fra-2. No entanto, Fra-1 exerce efeitos biológicos potentes por si mesma que foram mapeados na porção NH₂-terminal da proteína. A potencial transativação de Fra-1 é baixa, como revelado em ensaios de transfecção em diferentes tipos celulares. Foi documentado que sob essas condições de baixa transativação, Fra-1 controlou a motilidade celular em pelo menos três sistemas modelo (DEBINSKI e GIBO, 2005).

Este gene é considerado como um proto-oncogene e pode promover migração celular através da ativação de MMP1 e MMP9, que degradam proteínas da matriz extracelular (BELGUISE, 2005). Além disso, ele ativa a via de sinalização IL-6/JAK/Stat3 em macrófagos associados ao tumor, o que resulta no aumento da liberação de fatores pró-angiogênicos e da invasão e progresso do câncer de mama (YANG *et al.*, 2013).

A ativação de *FOSL1* é suficiente para modular o fenótipo de células de tumor epitelial, induzir a expressão de alguns marcadores de carcinoma maligno e ativar a mobilidade e invasividade dessas células. Esses dados ressaltam a importância de *FOSL1* no desenvolvimento de tumores epiteliais (KUSTIKOVA *et al.*, 1998).

FOSL1 encontra-se superexpresso em diversos cânceres humanos, incluindo o de mama (PENNANEN *et al.*, 2011). Diversos estudos demonstraram a importância da alta expressão de *FOSL1* na transformação, aumento de mobilidade e invasividade de linhagens celulares de câncer de mama (BELGUISE *et al.*, 2005; MILDE-LANGOSCH, 2005; YOUNG e COLBURN, 2006).

A expressão elevada de *FOSL1* foi detectada em células de carcinoma epitelioide de mama, e particularmente em linhagens de câncer de mama RE-negativas (PENNANEN, SARVILINNA e YLIKOMI, 2009). Zajchowski *et al.* (2001) e Luo *et al.* (2010) observaram que ele é superexpresso em linhagens celulares de câncer de mama altamente agressivos.

2.2.2 *GSTP1*

Glutathionas S-transferases (GSTs) formam uma superfamília de enzimas de fase 2 de metabolização, que tem função importante na detoxificação, catalisando a conjugação de muitos compostos hidrofóbicos e eletrofílicos com a glutathiona

reduzida (Figura 5). Estes compostos tóxicos, normalmente poliaromáticos, por sua característica lipofílica, podem ser armazenados no tecido mamário, e são mais encontrados em mulheres com câncer de mama do que nas sadias (UNLU *et al.*, 2008; VECANOVA *et al.*, 2011; CHIRILĂ *et al.*, 2014; KHABAZ, 2014).

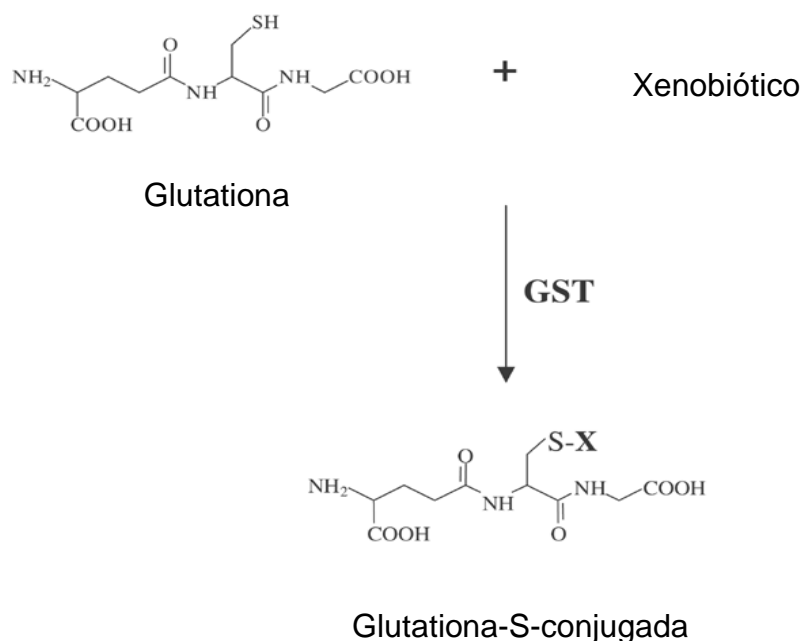


Figura 5: Exemplo da conjugação da glutathione com um xenobiótico hipotético efetuada pela GST.

Baseado nas suas propriedades bioquímicas, imunológicas e estruturais, as GSTs solúveis são categorizadas em 6 classes: α , μ , ω , π , ϕ , ϵ , pelo menos três delas presente tanto em tecido normal quanto em tumores mamários. Estas enzimas são protetoras contra danos no DNA causados por agentes oxidativos internos e externos (produtos do metabolismo lipídico e do estresse oxidativo) e pela formação de adutos de DNA através da conjugação de compostos xenobióticos (herbicidas, inseticidas, carcinógenos ambientais, agentes alquilantes e platina) com a glutathione, resultando em metabólitos menos tóxicos e mais facilmente excretáveis pela urina (UNLU *et al.*, 2008; VECANOVA *et al.*, 2011; CHIRILĂ *et al.*, 2014; KHABAZ, 2014).

Apesar de menos de 10% da sequência da proteína ser conservada, todas as isoformas GST apresentam dois domínios altamente conservados (o sítio G, para ligação da glutathione e o sítio H, para ligação dos compostos hidrofóbicos) e topologias similares (TEW *et al.*, 2011).

Membro importante da família GST, a glutathione S-transferase pi é codificada por um gene polimórfico localizado em 11q13.2, expresso tanto em tecido

normal quanto em tumores, inclusive de mama, e linhagens celulares resistentes a drogas, sendo a mais ubíqua e prevalente das GSTs em tecidos não-hepáticos, localizando-se tanto no núcleo quanto no citoplasma (TEW *et al.*, 2011; VECANOVA *et al.*, 2011; KHABAZ, 2014).

A expressão de GSTP1 apresenta uma correlação com baixo grau histológico de tumores de mama (FRANCO *et al.*, 2012) e a sua expressão aumentada foi relacionada à resistência a drogas em carcinoma de ovário, de cabeça e pescoço e de pulmão de células escamosas (PERQUIN *et al.*, 2000). Sua expressão em carcinomas mamários é variável, e é associada à baixa expressão do receptor de estrógeno pelo tumor. A diminuição da expressão de GSTP1 em uma linhagem de células T favorece a apoptose e sua inibição induz a apoptose em células de hepatoma em ratos (HUANG *et al.*, 2003).

Apesar de que normalmente se encontram altos níveis de GSTP em fenótipos malignos, existem exceções. A hipermetilação da região regulatória de *GSTP* é uma alteração somática comum em câncer de próstata e resulta na perda de expressão de GSTP e é provável que ocorra durante o desenvolvimento da doença (TEW *et al.*, 2011).

Polimorfismos no gene *GSTP1* modificam as características desta enzima, aumentando ou diminuindo a sua atividade e afinidade pelos substratos. Estudos epidemiológicos sobre a potencial influência dos polimorfismos deste gene sobre o câncer de mama apresentam resultados inconclusivos (KHABAZ, 2014), mas podem estar associados à resposta ao tratamento neoadjuvante (VECANOVA *et al.*, 2011; CHIRILĂ *et al.*, 2014).

2.2.3 NTSR1

O receptor 1 de alta afinidade para neurotensina (NTSR1) pertence a uma superfamília de receptores acoplados à proteína G (KITABGI, 2006) codificado pelo gene *NTSR1*, localizado em 20q13.33, e medeia as diversas funções da neurotensina (NTS).

O NTSR1 é um receptor endocisado depois de exposição à NTS. Foi demonstrado que exposição crônica e intensa à NTS determina a ativação

continuada da sinalização de NTSR1 e dos genes alvo da NTS. Essas condições celulares são similares à exposição autócrina e parácrina que ocorre em células tumorais, uma vez que os dois fatores se encontram expressos em cânceres humanos (YOUNES *et al.*, 2014).

A NTS é um peptídeo de 13 aminoácidos, descoberto por Carraway e Leeman em 1973 (CARRAWAY e LEEMAN, 1973), localizado principalmente no sistema nervoso central (principalmente no hipotálamo e glândula pituitária) e nas células endócrinas (células N) do jejuno e do íleo. A sua ação como neuromodulador do sistema nervoso central foi e continua sendo extensivamente estudada desde sua descoberta (DUPOUY *et al.*, 2011). No sistema periférico, a NTS tem dupla função, como modulador endócrino e parácrino do trato digestivo e como fator de crescimento para diversas células normais e cancerosas (WU *et al.*, 2013). A NTS é liberada das células N enteroendócrinas do trato gastrointestinal em resposta à ingestão de lipídios. O peptídeo exerce, predominantemente, a regulação hormonal e neurócrina do processo digestivo, incluindo a inibição da mobilidade do intestino delgado e as secreções de ácido gástrico, a estimulação das secreções pancreáticas e biliares, a facilitação da absorção de ácidos graxos e o crescimento de tecidos gastrointestinais, hepatócitos e fibroblastos da glândula adrenal (EVERS, 2006; DUPOUY *et al.*, 2011).

A NTS também está envolvida na transferência de células do sistema imune para locais de inflamação. Uma vez transferidas para o microambiente do tumor, essas células fornecem moléculas como fatores de crescimento, sobrevivência, pró-angiogênicos, enzimas modificadoras de matriz extracelular ou espécies reativas de oxigênio, que potencialmente promovem ações para o desenvolvimento tumoral (DUPOUY *et al.*, 2011).

Diversas vias de sinalização potencialmente envolvidas na proliferação, sobrevivência, migração celular e invasão são descritas após a estimulação de NTSR1 (Figura 6). Há evidências de uma atividade estratégica da NTS na carcinogênese, descrita em muitos tipos de câncer envolvida em cada estágio da progressão tumoral, com efeitos de proliferação e sobrevivência, metastatização, crescimento independente de ancoragem e efeitos pró-migratórios e pró-invasivos. Todos esses eventos celulares são presumidamente ativados devido à expressão anormal do NTSR1 durante os estágios iniciais de transformação celular (CARRAWAY e PLONA, 2006; DUPOUY *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2013).

O *NTSR1* não é expresso em células normais de diversos tecidos, mas encontrado em muitos tecidos e células tumorais. A superexpressão de *NTSR1* foi identificada como um marcador de mau prognóstico nos carcinomas de mama, pulmão e cabeça e pescoço (SOMAÏ *et al.*, 2002; SOUAZÉ, 2006; DUPOUY *et al.*, 2011). Sua função foi associada à progressão neoplásica em células de próstata, cólon, prevenção de apoptose em células de câncer de mama e indução do potencial pró-invasivo de células de câncer de cólon (DUPOUY *et al.*, 2009).

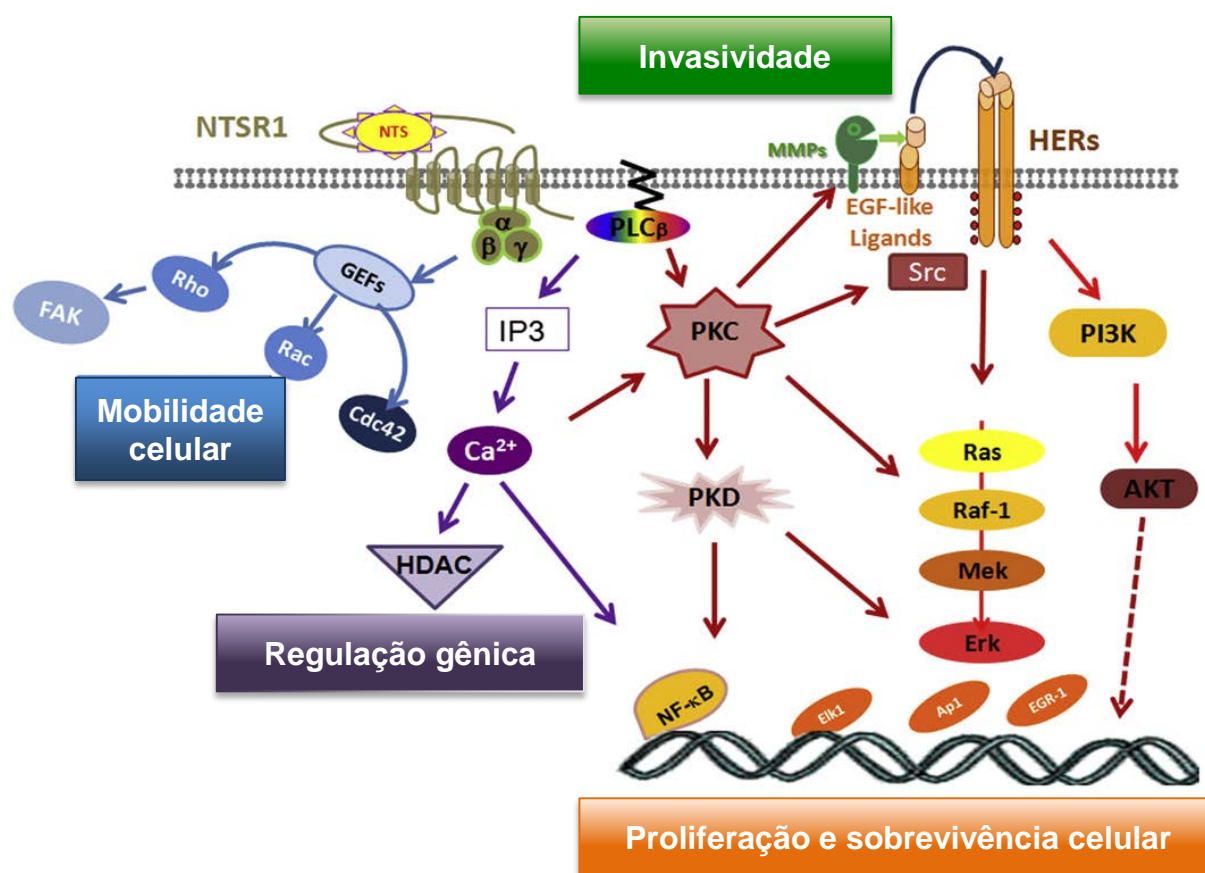


Figura 6: Via simplificada pela qual o complexo NTS/NTSR1 pode contribuir para o desenvolvimento e a progressão tumoral, influenciando a regulação gênica e induzindo mobilidade, proliferação e sobrevivência celular e invasividade. Adaptado de DUPOUY *et al.*, 2011.

A ativação exógena de *NTSR1* determina a proliferação celular, sobrevivência, mobilidade e invasão em células cancerosas de diversas origens. Esses efeitos são o resultado da ativação de cinases e efetores, como PKC, MAPK, FAK, RHO-GTPase, RAS e Scr (WU *et al.*, 2013).

A contribuição do complexo NTS/NTSR1 na estimulação do crescimento tumoral foi descrita em diversos estudos utilizando antagonistas de NTSR1 (SR48692 e SR142948A) (GULLY *et al.*, 1993; GULLY *et al.*, 1997). Uma diminuição

de pelo menos 50% do volume e do peso tumoral foi observada em animais tratados diariamente com um antagonista de NTSR1. Esses resultados foram confirmados usando RNA de interferência, com efeito adicional no crescimento do tumor quando a expressão de *NTSR1* foi completamente eliminada em tumores de mama e pulmão. Essas observações sugerem que a via de sinalização da neurotensina pode ser um alvo para o desenvolvimento de agentes diagnósticos e de drogas antitumorais (CARRAWAY e PLONA, 2006; DUPOUY *et al.*, 2011).

NTS e NTSR1 são concomitantemente superexpressos em pacientes com câncer de mama, interferindo em diversas características celulares, como proliferação, sobrevivência, aderência, migração e invasão, com efeito sinérgico entre NTS e EGF na migração celular e invasividade. O perfil de expressão de NTSR1 desregulado foi correlacionado com parâmetros de prognóstico negativo, como tamanho do tumor, número de linfonodos comprometidos, grau histopatológico de Scarff, Bloom e Richardson e mortalidade. A alta proporção de NTS no sangue também é correlacionada com o aumento do risco de câncer de mama (DUPOUY *et al.*, 2009; DUPOUY *et al.*, 2014).

Reubi *et al.* (1998) salientaram a importância da superexpressão de NTSR1 para discriminar entre tumores pancreáticos malignos exócrinos e endócrinos. A superexpressão de NTSR1 foi detectada em 75% dos tumores ductais pancreáticos altamente agressivos, e não foi detectada em tecido normal nem em pancreatite crônica ou tumores endócrinos.

Em um estudo de análise de expressão gênica em tumores de cabeça e pescoço, pacientes que apresentavam alta expressão de NTS e NTSR1 também apresentavam maior taxa de metástases a distância e menor taxa de sobrevida livre de metástase, comparado com pacientes com menores níveis de expressão de NTS e NTSR1. Além disso, foi identificado alto nível de expressão de NTSR1 como um fator de menor sobrevida em pacientes com carcinoma de pulmão e mama. Nos dois casos, NTSR1 não foi detectado em células epiteliais normais (DUPOUY *et al.*, 2011).

2.2.4 FADD

O gene FADD (domínio de morte celular associado à Fas) está localizado em 11q13.3 e codifica uma molécula adaptadora que, desde a sua descoberta em 1995 por Chinnayian *et al.* tem sido descrita como o principal integrante da sinalização dos receptores com domínio de morte celular, como o receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNFR1), o receptor de morte celular 3 (DR3) e os ligantes indutores de apoptose relacionados ao TNF (TRAIL-R1 e TRAIL-R2) (VILMONT *et al.*, 2015).

A partir da ativação dos seus receptores pelos respectivos ligantes, a FADD faz a interação entre o receptor de morte celular Fas e as caspases proximais 8 ou 10 para formar um complexo sinalizador indutor de morte celular (DISC) durante a apoptose (Figura 7) (KUANG *et al.*, 2000; THOMAS, STILLMAN e THORBURN, 2002; SHEIKH e HUANG, 2003; CHOI *et al.*, 2014, VILMONT *et al.*, 2015).

Fas, TNF-R1, e DR3, os três primeiros receptores com domínios de morte celular a serem identificados, iniciam a apoptose através da proteína adaptadora FADD. Esta, por sua vez, necessita de uma caspase para formar o DISC, que resulta na ativação da cascata da caspase e eventualmente, à morte celular (KUANG *et al.*, 2000).

A proteína FADD contém um domínio de morte celular (DD) na porção C-terminal e um domínio efetor de morte celular (DED) na porção N-terminal. Acredita-se que a FADD interaja com os receptores de morte celular (os TNFR) (FAN *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2014) e com as caspases proximais através de DD e DED, respectivamente (FARES *et al.*, 2014).

A família das caspases é composta por proteases intracelulares que colaboram nas cascatas proteolíticas. Nestas cascatas proteolíticas, as caspases podem estar tanto a montante, como iniciadores, quanto a jusante, como efetores da apoptose. Uma das vias de ativação das caspases é a via extrínseca da apoptose: dos trinta membros da família dos TNFR, oito contém DD na sua cauda citosólica. Eles utilizam a ativação de caspases como mecanismo de sinalização. A ligação destes receptores na superfície celular resulta na necessidade de diversas proteínas intracelulares, incluindo algumas pro-caspases, formando um DISC que dispara a ativação das caspases. A caspase 8 e, em alguns casos, a caspase 10 são especificamente importantes para a formação do DISC. Elas contém um DED na porção N-terminal, que se liga ao DED correspondente na proteína adaptadora

FADD, ligando-as assim aos complexos do receptor de morte celular da família TNF (HASSAN *et al.*, 2014).

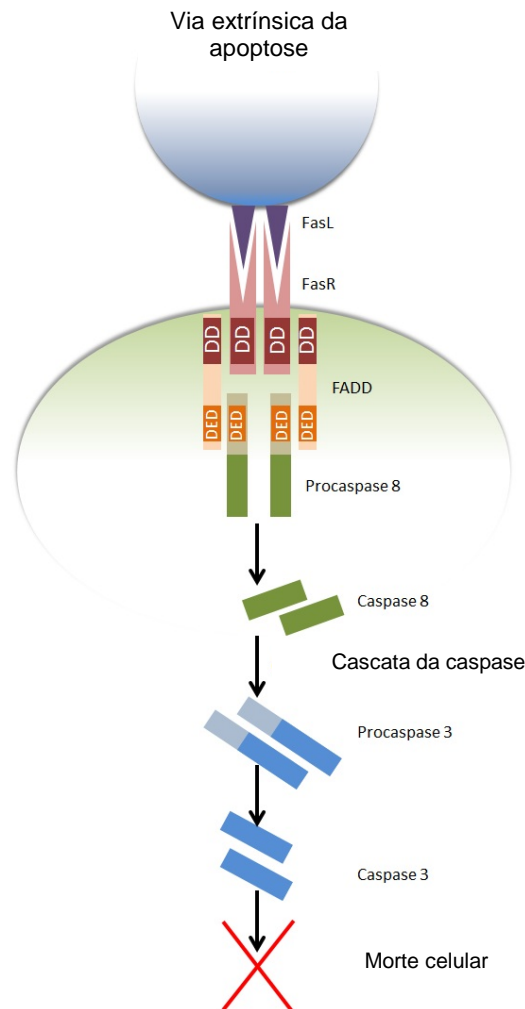


Figura 7: Esquema da via extrínseca da apoptose. Adaptado de
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Extrinsic_apoptosis.jpg#/media/File:Extrinsic_apoptosis.jpg

A FADD se liga diretamente ao Fas para ativar a caspase 8 em resposta ao ligante Fas e se liga à proteína adaptadora TRADD para ativar a caspase 8 em resposta ao TNF- α . Assim, a interação que importa para a ativação da caspase pela Fas é entre os domínios de morte celular de FADD e Fas, enquanto a interação correspondente para a ativação da caspase induzida por TNF- α é entre os domínios de morte celular de FADD e TRADD (THOMAS, STILLMAN e THORBURN, 2002).

Os domínios de morte celular também são encontrados em três proteínas adaptadoras citoplasmáticas que fazem a mediação da apoptose através de seus domínios DD: as proteínas associadas a FADD, o domínio de morte celular

associado a TNFR1 (TRADD), e a proteína de interação com o receptor (RIP). Apesar da homologia de sequência presente nos receptores que contém domínios de morte celular, o FADD não induz apoptose quando superexpresso em células de mamíferos, e na realidade, pode bloquear a apoptose mediada por Fas e TNFR1. Ao contrário, o domínio DED pode induzir apoptose quando superexpresso. Enquanto Fas pode se ligar diretamente ao FADD, acredita-se que TNFR1 e DR3 se liguem ao FADD pela molécula adaptadora intermediária que contém o domínio de morte TRADD (CHAUDHARY *et al.*, 1997).

Além do papel de FADD na apoptose, ela já foi descrita como um elemento importante em diversos processos biológicos, como o desenvolvimento embrionário, proliferação celular, progressão do ciclo celular, desenvolvimento tumoral, imunidade inata e autofagia. Todas essas funções são finamente reguladas de diversas formas, como a fosforilação e a localização diferencial (VILMONT *et al.*, 2015).

Baseado na função de FADD como uma molécula adaptadora chave da via extrínseca de apoptose, seus sítios de ação primários seriam as regiões intracelulares citoplasmáticas ricas em complexos de sinalização ativados por receptores (CHAUDHARY *et al.*, 1997; SHEIKH e HUANG, 2003; FARES *et al.*, 2014), porém Sheikh e Huang (2003) observaram sua presença no núcleo celular. Os autores acreditam que mantendo a proteína no núcleo, evita-se a ativação constitutiva da via de apoptose extrínseca, uma vez que estando no citoplasma, FADD poderia se ligar às moléculas-alvo e disparar a cascata de apoptose. Sugerem ainda que, no núcleo, FADD desempenhe função de manutenção da integridade do genoma, ao interagir com a proteína 4 com domínio de ligação a metil-CpG (MBD4), que atua na manutenção da integridade do genoma e repara mal pareamentos GT, que podem originar mutações pontuais.

A expressão de *FADD* foi associada a metástases de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) e ao pior prognóstico em carcinoma de células escamosas oral e em adenocarcinoma de pulmão (CHOI *et al.*, 2014). *FADD* é considerado um gene causador de amplificação na região 11q13.3, que está associada com o aumento de metástases em HNSCC e em câncer de mama (PATJJE *et al.*, 2013).

Matsuyoshi *et al.* (2006), com um estudo *in vitro*, mostraram que a superexpressão de um mutante que mimetiza o FADD desfosforilado na serina 194 aumentou a capacidade de invasão de tumores RE-positivos e negativos.

2.2.5 *CCND1*

O gene *CCND1*, localizado em 11q13, codifica a proteína reguladora do ciclo celular ciclina D1, cuja principal função é dirigir a progressão da fase G1 do ciclo celular (KIRKEGAARD *et al.*, 2008; RAVIKUMAR e ANANTHAMURTHY, 2014).

O termo “ciclina” foi usado inicialmente para descrever uma família de proteínas que possuem picos de concentração diferentes durante o ciclo celular e que regulam a atividade das CDKs (cinase dependente de ciclina) (BARNES e GILLET, 1998). Essas proteínas cinases são as principais reguladoras de importantes transições do ciclo celular em diversos sistemas eucarióticos. Em células de mamíferos, foram identificados pelo menos seis tipos de ciclinas, que atuam em estágios específicos do ciclo celular. A acumulação de ciclinas resulta na ativação de suas parceiras CDK e, conseqüentemente, na fosforilação de proteínas. Essas cascatas de fosforilação são de grande importância nas diversas transições do ciclo celular (ZWIJSEN *et al.*, 1997).

As ciclinas do tipo D são fortemente envolvidas no controle da passagem pela fase G1 do ciclo celular. Três ciclinas do tipo D foram identificadas em humanos (D1, D2 e D3), e todas interagem com CDK4 e CDK6 e as ativam, ainda que tenham funções específicas em tipos celulares distintos. Dentre as ciclinas do tipo D, a ciclina D1 é fortemente oncogênica (ZWIJSEN *et al.*, 1997; BARNES e GILLET, 1998; KIRKEGAARD *et al.*, 2008).

A ciclina D1 é sintetizada em resposta a fatores de crescimento, assim, a não ser que a célula tenha passado do ponto de checagem e esteja pronta para se dividir, a remoção dos fatores de crescimento levará à queda brusca dos níveis de ciclina D1 e a célula vai parar em G1 (BARNES e GILLET, 1998). A indução da ciclina D1 em linhagens celulares de câncer de mama resulta no aumento do número de células progredindo por G1. Esta observação é apoiada por outros estudos que demonstram que a entrada na fase S é impedida pela inibição da expressão da ciclina D1, sugerindo que ela é essencial para a progressão de G1 (ROY e THOMPSON, 2006).

A ciclina D1 também está intimamente envolvida no controle do ciclo celular das células epiteliais mamárias normais e neoplásicas, regulando as respostas mitogênicas a esteroides e fatores de crescimento nessas células. Além disso, a superexpressão de ciclina D1 em células de câncer de mama com crescimento interrompido em cultura foi suficiente para que elas voltassem a crescer e progredissem no ciclo celular na ausência de fatores de crescimento (SESHADRI *et al.*, 1996).

A ciclina D1 pode interagir com uma variedade de fatores de transcrição, sugerindo uma função de regulador de transcrição além da bem estabelecida função na progressão do ciclo celular dependente de CDK (ROY e THOMPSON, 2006).

Ao se ligar às CDKs 4 e 6, as ciclinas de classe D fosforilam diversos substratos, incluindo a proteína Rb. A fosforilação e consequente inativação de Rb resulta na liberação de fatores de transcrição, predominantemente aqueles pertencentes à família E2F, que por sua vez ativam diversos genes responsáveis pela progressão para a fase S do ciclo celular (Figura 8) (DIEHL, 2002; ROY e THOMPSON, 2006; BURANDT *et al.*, 2014; RAVIKUMAR e ANANTHAMURTHY, 2014).

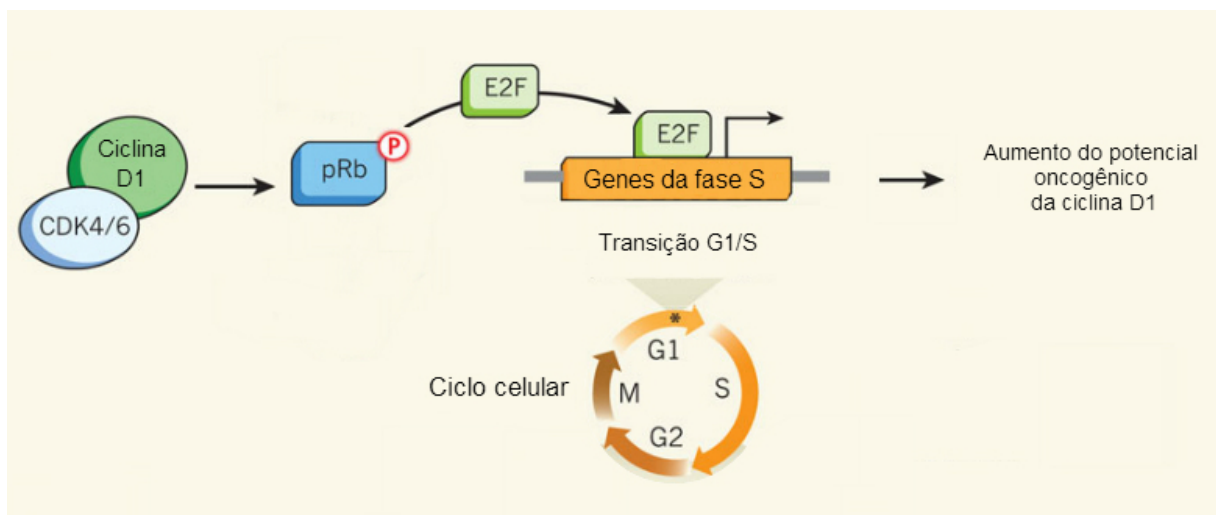


Figura 8: A ciclina D1 interage com as CDK4 ou CDK6 iniciando a fosforilação dos repressores da transcrição da família da pRb. Como resultado, os fatores de transcrição E2F são liberados, permitindo a síntese dos genes da fase S do ciclo celular. Esta atividade da ciclina D1 tem seu auge no final da fase G1 (*). Adaptado de BARTEK e LUKAS, 2011.

A ciclina D1 também tem funções independentes das CDKs (KIRKEGAARD *et al.*, 2008). Interessante é a ativação do receptor de estrogênio independente de ligante, o que possivelmente poderia induzir insensibilidade ao estrogênio

(BOSTNER *et al.*, 2007; HOLM *et al.*, 2012). Através desse mecanismo, a ciclina D1 pode regular o crescimento de tecidos responsivos a estrogênio na ausência deste hormônio. A ciclina D1 se liga ao domínio de ligação do hormônio no RE e promove a associação entre o receptor e um de seus coativadores, resultando no aumento da transcrição mediada pelo receptor. Esta atividade da ciclina D1 antagonista ao RE independente de estrógeno constitui a sua função oncogênica em tumores de mama RE-positivos (ROY e THOMPSON, 2006; RAVIKUMAR e ANANTHAMURTHY, 2014).

Estudos experimentais mostram que o gene *CCND1* é um alvo transcricional do ER α ativo. Células da linhagem de câncer de mama MCF-7 com tratamento antiestrogênio diminuíram a expressão de ciclina D1 e as células eventualmente entraram no estado G0 (BOSTNER *et al.*, 2007).

Alguns estudos demonstram o envolvimento da ciclina D1 no desenvolvimento de alguns tipos de tumor, incluindo o de mama, tanto em humanos quanto em camundongos, com superexpressão frequentemente citada como um potencial biomarcador (ZWIJSEN *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 2013; RAVIKUMAR e ANANTHAMURTHY, 2014).

A superexpressão da ciclina D1 e o seu acúmulo no núcleo das células tumorais resultam de translocações cromossômicas, amplificação gênica e potencialmente da desregulação da proteólise e do tráfego intercelular normal (DIEHL, 2002). A translocação t(11;14) ativa o gene *CCND1* em neoplasmas de células B como resultado da justaposição com elementos regulatórios do loco da cadeia pesada das imunoglobulinas, assim como pela inversão intra-cromossomal em adenomas de paratireoide, onde ele fica sob influência do gene do hormônio da paratireoide em 11p15. Essas observações significam que a expressão desregulada de *CCND1* tem contribuição direta no fenótipo dessas lesões e que portanto se qualifica como um proto-oncogene (GILLET *et al.*, 1994).

A superexpressão de ciclina D1 torna as células do câncer de mama menos dependentes dos fatores de crescimento, sugerindo que esta superexpressão possa levar à perda da regulação normal e conferir uma vantagem de crescimento a estas células. Consistente com esta proposição, a expressão desregulada de ciclina D1 estimula a proliferação de células mamárias epiteliais e promove tumorigênese em camundongos transgênicos. Isto demonstra que o *CCND1* é um proto-oncogene na glândula mamária murina, no entanto, o longo período de latência necessário para o

desenvolvimento do tumor indica que sozinho, este é um proto-oncogene fraco e necessita da cooperação de outros oncogenes para uma carcinogênese eficiente (ORMANDY *et al.*, 2003)

O gene *CCND1* encontra-se amplificado em 15-20% e superexpresso em 45-50% dos cânceres de mama, sendo que alguns autores afirmam chegar a 90%, sugerindo que outros mecanismos além da amplificação também podem desregular a sua expressão (BARNES e GILLET, 1998; DIEHL, 2002; ROY e THOMPSON, 2006; KIRKEGAARD *et al.*, 2008; HOLM *et al.*, 2012; BURANDT *et al.*, 2014).

A amplificação e a superexpressão do gene *CCND1* são frequentemente observadas em muitas neoplasias, particularmente no câncer de mama (GILLET *et al.*, 1994; ZWIJSEN *et al.*, 1997; BARNES e GILLET, 1998; KIRKEGAARD *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2013).

Há evidências de este gene seja importante para o desenvolvimento da glândula mamária, no controle da progressão do ciclo celular em células epiteliais e na tumorigênese mamária. Camundongos transgênicos que expressam ciclina D1 sob o controle do promotor específico da glândula mamária tem desenvolvimento prematuro dos alvéolos lobulares e hiperplasia epitelial, originando adenocarcinomas após um longo período. Por outro lado, em camundongos sem ciclina D1 não há desenvolvimento de alvéolos lobulares durante a gestação, corroborando a importância deste gene no desenvolvimento da glândula mamária (SESHADRI *et al.*, 1996; ROY e THOMPSON, 2006; BURANDT *et al.*, 2014).

Sicinski *et al.* (1995) observaram que camundongos *CCND1* (-/-) são muito menores que os normais e possuem problemas de visão, com número reduzido de células na retina e possuem hipoplasia na região da retina, sugerindo uma ligação entre a ciclina D1 e a pRb. Outra característica dos camundongos *knockout* para o gene *CCND1* é a ausência de desenvolvimento da glândula mamária após o nascimento, o que determina a ausência de lactação (BARNES e GILLET, 1998).

A superexpressão da ciclina D1 pode fornecer uma vantagem no crescimento de células tumorais e também contribuir para a resistência à terapia antiendócrina (ROY e THOMPSON, 2006), porém é um bom fator prognóstico em câncer de mama invasivo com melhor expectativa de sobrevida e sobrevida livre de doença particularmente para pacientes com tumores RE-positivos. Por outro lado, a amplificação gênica está relacionada à recidiva precoce e pior prognóstico em tumores RE-positivos. Esta controvérsia sobre a importância prognóstica da proteína

e do gene vem da falta de estudos abordando as duas variáveis na mesma amostra (ROY e THOMPSON, 2006; BURANDT *et al.*, 2014; RAVIKUMAR e ANANTHAMURTHY, 2014).

3. JUSTIFICATIVA

Como nos referimos na Introdução deste projeto, dados descritos pelo nosso grupo de pesquisa (TORRESAN, 2011) em colaboração com a *Georgetown University*, Washington, DC, USA, investigando alterações do número de cópias do DNA através da metodologia de CGH-array em amostras de tumores primários e metástases nos linfonodos sentinela correspondentes, demonstraram que 90% das alterações mais frequentes foram comuns aos dois grupos com localização preferencial nas regiões cromossômicas 1q21.3-q22, 6p22.1, 8q24.3, 11q13.1, **11q13.1-q13.2**, **11q13.2-q13.3**, 17q25.3 e **20q13.33**. Através de diferentes *softwares*, como *Nexus-Biodiscovery*, *Script* entre outros, especialistas em bioinformática da Universidade de Georgetown identificaram nestas regiões cromossômicas os genes *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD* e *CCND1*, indicados para a análise de processos biológicos e sinalização celular, como possivelmente envolvidos no processo de metastatização para linfonodos axilares.

Estes achados determinaram a motivação para que estes genes fossem analisados com maior ênfase, com metodologias que os acessasse em nível gênico, com o objetivo principal de avaliar o seu envolvimento nos processos de iniciação e progressão dos cânceres mamários humanos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Analisar as alterações de número de cópias de DNA e a expressão dos genes *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD* e *CCND1* em tumores primários de mama de pacientes sem (LN-) e com metástases (LN+) em linfonodos axilares para investigar sua relevância no desenvolvimento e/ou progressão tumoral, assim como sua função como indicador de prognóstico.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar as alterações de número de cópias dos genes *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD* e *CCND1* em LN- e LN+.
2. Verificar a expressão dos genes *FOSL1*, *GSTP1*, *FADD* e *CCND1* nas mesmas amostras;
3. Verificar se as alterações da expressão destes genes dependem das alterações de número de cópias do DNA;
4. Analisar os resultados obtidos em função de parâmetros clínicos e histopatológicos;
5. Considerar a distribuição das alterações do número de cópias encontradas entre LN- e LN+ e em relação aos parâmetros clínicos e histopatológicos como indicador prognóstico.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção e processamento das amostras

As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas de 137 pacientes, portadoras de carcinomas mamários, durante o procedimento cirúrgico no Hospital Nossa Senhora das Graças e no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, ambos de Curitiba, Paraná, entre 1998 e 2014. Cada paciente recebeu informações sobre os objetivos da pesquisa e assinou o Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido.

Neste trabalho, foram utilizadas 10 amostras de doadoras sem câncer de mama como controle dos ensaios de número de cópias de DNA e 5 amostras de tecido mamário não-tumoral da mama contralateral de pacientes com câncer de mama como controle dos ensaios de expressão gênica.

Após a coleta, parte do material foi mantido no meio de transporte RNAlater® (Ambion Inc. Applied Biosystems), para preservar do RNA até o momento da extração.

Ao chegar ao laboratório, as amostras são registradas em um caderno de entrada, onde recebem um código alfanumérico, que é usado para identificação da amostra a partir desse momento. Depois, elas são processadas para a remoção de tecido adiposo e vasos sanguíneos, utilizando tesouras e pinças esterilizadas e placas de Petri. O material é estocado em tubos do tipo *Eppendorf* e mantido a -80°C para futuras análises.

Os dados clínicos e histopatológicos (data da cirurgia, idade da paciente, tipo e tamanho do tumor, estado dos receptores hormonais e evolução clínica) recebidos em forma de laudos anatomopatológicos e de imuno-histoquímica são registrados no banco de dados do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética para a posterior análise.

O presente estudo faz parte de um amplo projeto de pesquisa que objetiva a análise genética em tumores mamários. Foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba, Paraná através do processo número

25000.007020/2003-93, com registro no CONEP número 7220 e parecer 251/2003 de 20 de fevereiro de 2003.

5.2 Caracterização da amostra

A amostra deste trabalho foi subdividida em duas sub-amostras: carcinomas primários de mama sem metástases em linfonodos axilares (LN-) n=53 e carcinomas primários de mama com metástases em linfonodos axilares (LN+) n=84.

As amostras de carcinoma primário utilizadas são do tipo histológico ductal invasivo, proveniente de pacientes do sexo feminino com média de idade ao diagnóstico de $57,0 \pm 13,79$ anos (LN-) e $54,3 \pm 13,56$ anos (LN+) ($t=1,13$; $P>0,20$). Os dados clínicos e histopatológicos encontram-se nos Apêndices 1 e 2.

5.3 Extração do DNA

A extração de DNA foi feita pelo método de fenol-clorofórmio, como descrito a seguir: fragmentos do tumor sólido foram digeridos em 130µl de tampão de proteinase K e 70µl de proteinase K 10µg/ml durante incubação em banho-maria a 55°C por 24 horas. Em seguida foi realizada a inativação da proteinase K, colocando os tubos em banho seco a 95°C por 10 minutos. Posteriormente foram feitas duas lavagens com a adição de 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1 v/v, seguido de homogeneização no vórtex por 15 segundos e centrifugação a 20,800 rcf (14.000 rpm) por 15 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 2 volumes de etanol absoluto e 0,2 volumes de acetato de amônio 7,5M e o tubo foi mantido no freezer -20°C por 24 horas. Em seguida ocorreu a centrifugação a 20,800 rcf (14.000 rpm) por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado, seguido da lavagem do precipitado com 1ml de etanol 70% e centrifugação a 20,800 rcf (14.000 rpm) por 5 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o DNA ressuspensionado em 40µl de água ultrapura.

5.4 Análise do número de cópias de DNA

A técnica de PCR quantitativa em tempo real foi realizada para a determinação de alterações do número de cópias dos genes *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD* e *CCND1* em 137 amostras de DNA de tumores primários de mama.

Para a avaliação do número de cópias dos cinco genes descritos acima foram utilizados os ensaios *TaqMan® Copy Number Assays* da empresa Life Technologies™. Essa metodologia é baseada em uma reação dupla de PCR em tempo real que detecta a sequência do gene alvo do estudo e a sequência de um gene de referência conhecido por apresentar duas cópias em um genoma diploide (normalizador da reação). Neste caso foi utilizado o gene da RNase P, *RPPH1*.

Em todas as placas do experimento foi incluído um controle negativo e uma amostra como controle diploide (calibrador), que se constituiu de uma mistura de DNA genômico de 10 mulheres sem câncer de mama de diferentes origens étnicas (Brasil, Índia, China, México e Estados Unidos), com o intuito de minimizar os efeitos normais de variação de número de cópias interindividual. Este método de detecção relativa é usado para determinar o número de cópias do gene de interesse em um DNA genômico em relação ao calibrador, normalizado com o número de cópias do DNA de referência.

Para cada reação foram utilizados: 5µl de *TaqMan® Genotyping Master Mix* (2x), 0,5µl de ensaio do gene em estudo (contendo o par de *primers* e a sonda *TaqMan®*) (20x), 0,5µl de ensaio do gene da RNase P (20x), 2µl de DNA (5ng/µl) e 2µl de água ultrapura, totalizando 10µl de volume de reação. Todas as amostras, incluindo a mistura de DNA controle, foram analisadas em triplicata no *ViiA7 Real Time PCR Instrument* (Applied Biosystems™). As condições da PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

A localização das sondas, o tamanho dos fragmentos amplificados e os fluoróforos utilizados nos ensaios encontram-se na Tabela 1.

Apenas as amostras que apresentaram valores de $C_t < 33$ e de $Z\text{-score} \leq 2,65$ foram analisadas através do *software Copy Caller* (Life Technologies™). O número de cópias do DNA teste foi calculado pelo método da quantificação relativa:

$2^{-\Delta\Delta CT}$ multiplicado por 2 (indivíduos diploides) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Este método é adotado devido à padronização prévia dos ensaios de *primers* e sondas comercializados pela empresa que fornecem uma eficiência de reação de 100%, possibilitando que as curvas de amplificação entre os genes testados e o gene de referência possam ser comparadas com precisão.

Tabela 1: Genes, localização das sondas, tamanho dos fragmentos amplificados e fluoróforos utilizados nos ensaios de número de cópias de DNA.

Ensaio	Localização da sonda	Tamanho do amplicon (pb)	Marcação/ <i>quencher</i>
<i>FOSL1</i>	cr.11:65667898	87	FAM/NFQ-MGB
<i>GSTP1</i>	cr.11:67352208	77	FAM/NFQ-MGB
<i>NTSR1</i>	cr.20:61340805	109	FAM/NFQ-MGB
<i>FADD</i>	cr.11:70049619	99	FAM/NFQ-MGB
<i>CCND1</i>	cr.11:69456091	110	FAM/NFQ-MGB
<i>RPPH1</i>	cr.14:20811565	87	VIC/TAMRA

cr: cromossomo. pb: pares de bases.

5.5 Extração de RNA e retrotranscrição

A extração do RNA total das amostras foi realizada com o kit de extração *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit* (Life Technologies™) a partir de 0,03g de tecido tumoral, de acordo com as recomendações do fabricante. A qualidade e a concentração do RNA foi determinada pelo espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade) e a partir daí foram preparadas soluções de trabalho a 120ng/μl.

Posteriormente, foi feita a retrotranscrição de 1200ng de RNA em um volume final de 20μl para síntese de DNA complementar (cDNA) com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante. Para cada reação, foram utilizados: 2μl de tampão de retrotranscrição 10x, 2μl de iniciadores randômicos 10x, 0,8μl de dNTP 100mM, 1μl de transcriptase reversa MultiScribe™, 10μl de RNA 120ng/μl e 4,2μl de água ultrapura.

As condições da reação de retrotranscrição foram as seguintes: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e 4°C até o momento da estocagem das amostras.

5.6 Análise de expressão gênica

A análise de expressão gênica foi realizada em 31 amostras, 18 LN- e 13 LN+, por RT-qPCR. Todas as reações foram realizadas no *ViiA7 Real Time PCR Instrument* (Applied Biosystems™) utilizando os ensaios *TaqMan® Gene Expression Assays* (Life Technologies™) de acordo com as especificações do fabricante. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a normalização com dois genes endógenos, *ACTB* e *GADPH*, a expressão dos genes *FOSL1*, *GSTP1*, *FADD* e *CCND1* foi avaliada por quantificação relativa utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK e SCHMITTEGEN, 2001) e a mistura dos cinco cDNAs das amostras de tecido mamário não-tumoral da mama contralateral como calibrador.

A localização das sondas, o tamanho dos fragmentos amplificados e os fluoróforos utilizados para cada ensaio podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2: Genes, localização das sondas, tamanho dos fragmentos amplificados e fluoróforos utilizados nos ensaios de expressão gênica.

Ensaio	Localização da sonda	Tamanho do amplicon (pb)	Marcação/quencher
<i>FOSL1</i>	cr.11: 65659692	100	FAM/NFQ-MGB
<i>GSTP1</i>	cr.11: 67351066	67	FAM/NFQ-MGB
<i>FADD</i>	cr.11: 70049269	112	FAM/NFQ-MGB
<i>CCND1</i>	cr.11: 69455873	57	FAM/NFQ-MGB
<i>GAPDH</i>	cr.12: 6643657	93	FAM/NFQ-MGB
<i>ACTB</i>	cr.7: 5566779	63	FAM/NFQ-MGB

cr: cromossomo. pb: pares de bases.

Para cada reação foram utilizados: 5µl de *TaqMan® Universal Master Mix* (2x), 0,5µl de ensaio (20x) do gene em estudo (contendo o par de *primers* e a sonda *TaqMan®*), 2µl de cDNA e 2,5µl de água ultrapura, totalizando 10µl de volume de reação. As reações foram realizadas em triplicada e um controle negativo foi incluído para cada conjunto de *primers* em cada placa. A análise dos resultados foi feita através do software *DataAssist™* (Life Technologies™).

O experimento de expressão gênica para o gene *NTSR1* não foi bem sucedido e os resultados não foram apresentados.

5.7 Análise estatística

O teste do Qui-quadrado (χ^2) e o teste exato de Fisher foram usados para comparar os resultados de número de cópias de DNA dos cinco genes entre as amostras e os diversos parâmetros histopatológicos analisados. As médias de idade e de tamanho do tumor e as análises de expressão gênica foram avaliadas pelos testes *t* de Student, de Bartlett, de Fisher e de Tukey. A dependência das variações da expressão gênica dos quatro genes em função da variação do número de cópias dos mesmos foi verificada pela análise do coeficiente de regressão (b). Para todas as análises, o nível de significância adotado foi $P \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

As informações clínico-histopatológicas e do número de cópias das amostras das pacientes sem (LN-) e com (LN+) metástases nos linfonodos axilares são apresentadas nos Apêndices 1 a 4. As mesmas estão detalhadas na descrição de cada item dos Resultados.

6.1 Análise do número de cópias de DNA

Conforme os dados apresentados na Tabela 3, as análises do número de cópias de DNA, por ensaios usando sondas TaqMan, foram realizadas em frequências que variaram de 86,79% (46/53) a 100% (84/84) para os genes *CCND1* e *GSTP1*, respectivamente das amostras LN- e LN+.

Na mesma tabela, observa-se que ganhos de número de cópias foram mais frequentes em ambas as amostras, com exceção para os genes *FOSL1* em LN+ e *GSTP1* em LN- e LN+ onde o número de cópias normal foi mais frequente. Em ambas as amostras, perdas, normal e ganhos não se distribuíram igualmente nos cinco genes analisados tanto em LN-, onde perdas e ganhos foram analisados em conjunto ($\chi^2_4=45,76$; $P<0,001$), como em LN+ ($\chi^2_8=190,78$; $P<0,001$).

Em cada gene e no total dos cinco genes, perdas, normal e ganhos de número de cópias de DNA (somente normal e ganhos nos genes *NTSR1* e *CCND1*) não apresentaram diferenças estatisticamente significantes comparados entre as amostras LN- e LN+. No entanto, considerando as perdas somente para o gene *FOSL1* e para o total e com base na ocorrência ao acaso do número de cópias, foram observadas, pelo teste do qui ao quadrado, diferenças estatisticamente significantes nas amostras LN-, LN+ e quando ambas foram consideradas em conjunto. Nas três comparações, somente o gene *FOSL1* não apresentou diferenças estatisticamente significantes; para o gene *GSTP1* o número de cópias normal foi maior do que os ganhos, e nos genes *NTSR1*, *FADD*, *CCND1* e no total dos cinco genes, os ganhos de número de cópias foram maiores do que o número de cópias normal.

Tabela 3: Distribuição das alterações de número de cópias dos genes *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD* e *CCND1* nas pacientes LN- e LN+.

GENES	<i>FOSL1</i>			<i>GSTP1</i>			<i>NTSR1</i>			<i>FADD</i>			<i>CCND1</i>			Total		
	LN-	LN+	Total	LN -	LN +	Total	LN -	LN +	Total	LN -	LN +	Total	LN -	LN +	Total	LN -	LN +	Total
	n (%)	n (%)	n	n (%)	n (%)	n	n (%)	n (%)	n	n (%)	n (%)	n	n (%)	n (%)	n	n (%)	n (%)	n
Perda	10 (20,83)	30 (36,58)	40	4 (7,84)	7 (8,33)	11	0 (0,00)	0 (0,00)	0	5 (10,64)	8 (10,53)	13	0 (0,00)	1 (1,31)	0	19 (7,79)	46 (11,50)	65
Normal	18 (37,50)	30 (36,58)	48	35 (68,63)	59 (70,24)	94	9 (17,31)	10 (12,20)	19	14 (29,79)	20 (26,32)	34	5 (10,87)	5 (6,58)	10	81 (33,19)	124 (31,00)	205
Ganho	20 (41,67)	22 (26,83)	42	12 (22,53)	18 (21,43)	30	43 (82,69)	72 (87,80)	115	28 (59,57)	48 (63,16)	76	41 (89,13)	70 (92,11)	112	144 (59,02)	230 (57,50)	374
Total	48 (36,92)	82 (63,08)	130	51 (37,78)	84 (62,22)	135	52 (38,80)	82 (61,20)	134	47 (38,21)	76 (61,79)	123	46 (37,70)	76 (62,30)	122	244 (37,89)	400 (62,11)	644
	$\chi^2_2=4,51$; $P>0,10$			$\chi^2_2=0,08$; $P>0,95$			$\chi^2_1=0,69$; $P>0,30$			$\chi^2_2=0,19$; $P>0,90$			$\chi^2_1=0,70$; $P>0,30$			$\chi^2_2=2,36$; $P>0,30$		

LN-: pacientes sem metástases nos linfonodos axilares, LN+: pacientes com metástases nos linfonodos axilares, n: tamanho amostral.

6.2 Análise da expressão gênica

Os valores da análise quantitativa do número de cópias e da expressão dos genes *FOSL1*, *GSTP1*, *FADD* e *CCND1* das amostras das pacientes LN- e LN+ são apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

O teste de Bartlett indicou que as variâncias das distribuições do número de cópias das amostras LN- ($\chi^2_{(3)corr.}=91,547$; $P<0,001$) e LN+ ($\chi^2_{(3)corr.}=12,982$; $P<0,001$) não são homogêneas, impossibilitando a comparação simultânea das médias de número de cópias apresentadas nas referidas tabelas. Na amostra LN- (Tabela 4) observou-se diferença estatisticamente significativa somente entre as médias dos genes *FOSL1* e *GSTP1* ($t=4,224$; $P<0,001$). Na amostra LN+ (Tabela 5), diferenças estatisticamente significantes foram observadas entre as médias dos genes *CCND1* e *FOSL1* ($t'=2,443>t_c=2,187$) e *CCND1* e *GSTP1* ($t'=3,140>t_c=2,160$). Considerando a somatória dos valores de cada gene das amostras LN- e LN+ (Tabela 5), diferenças significativas foram observadas entre as médias dos genes *CCND1* e *GSTP1* ($t'=2,756>t_c=2,052$) e *FOSL1* e *GSTP1* ($t=3,670$; $P<0,001$). Não se observou diferenças estatisticamente significantes entre as médias do mesmo gene de cada amostra e nem entre as médias de todos os genes de cada amostra (LN- $4,004\pm5,158$, $n=60$ e LN+ $3,462\pm2,427$, $n=44$).

Também, o teste de Bartlett indicou que as variâncias das distribuições da expressão dos genes não são homogêneas, tanto nas amostras LN- ($\chi^2_{(3)corr.}=128,471$; $P<0,001$) como nas LN+ ($\chi^2_{(3)corr.}=38,725$; $P<0,001$). Desta forma, como na análise do número de cópias, não foi possível a comparação simultânea das médias de expressão dos quatro genes. Na amostra LN- (Tabela 4) observou-se diferença estatisticamente significativa entre as médias dos genes *GSTP1* e *FOSL1* ($t=2,497$; $P<0,05$) e *FADD* e *FOSL1* ($t=4,081$; $P<0,01$). Na amostra LN+ (Tabela 5), diferença estatisticamente significativa foi observada somente entre as médias dos genes *FADD* e *FOSL1* ($t'=3,252>t_c=2,231$). Considerando a somatória dos valores de cada gene das amostras LN- e LN+ (Tabela 5), diferenças significativas foram observadas entre as médias dos genes *CCND1* e *FOSL1* ($t'=2,396>t_c=2,050$), *FADD* e *FOSL1* ($t'=5,070>t_c=2,024$) e *GSTP1* e *FOSL1* ($t'=2,445>t_c=2,036$). Não se

observou diferenças estatisticamente significantes entre as médias do mesmo gene de cada amostra e nem entre as médias de todos os genes de cada amostra (LN- $0,997 \pm 2,333$, $n=60$ e LN+ $1,079 \pm 1,731$, $n=44$).

Com o objetivo de avaliar a dependência das variações dos valores de expressão gênica em função das variações do número de cópias, aplicou-se o coeficiente de regressão para os dados das Tabelas 4 e 5.

Observa-se que somente o valor de b ($0,372 \pm 0,151$) para o gene *FADD* na amostra LN+ foi estatisticamente significativa ($t=2,464$; $P<0,05$). Os valores de b não apresentaram diferenças estatisticamente significantes para a somatória dos valores de cada gene das amostras LN- e LN+ (Tabela 5), para a somatória dos valores de todos os genes da amostra LN- (médias $4,004 \pm 5,158$ para número de cópias e $0,997 \pm 2,333$ para expressão, $b=0,027 \pm 0,059$, $t=0,458$; $P>0,60$, $n=60$), da amostra LN+ ($3,462 \pm 2,427$ e $1,079 \pm 1,731$, respectivamente número de cópias e expressão, $b=0,188 \pm 0,106$, $t=1,774$; $P>0,05$, $n=44$) e também para a somatória dos valores de LN- e LN+ ($3,775 \pm 4,228$ e $1,032 \pm 2,091$, respectivamente número de cópias e expressão, $b=0,048 \pm 0,049$, $t=0,980$; $P>0,30$, $n=104$).

Portanto, com exceção do gene *FADD* em LN+, os resultados indicam que as variações dos valores da expressão gênica não dependem das variações dos valores do número de cópias.

Tabela 4: Número de cópias e valores de expressão dos genes *FOSL1*, *GSTP1*, *FADD* e *CCND1* de 18 pacientes sem metástases nos linfonodos axilares, com as respectivas médias e valores dos coeficientes de regressão.

Genes	<i>FOSL1</i>		<i>GSTP1</i>		<i>FADD</i>		<i>CCND1</i>	
Amostra	Número de cópias	Expressão	Número de cópias	Expressão	Número de cópias	Expressão	Número de cópias	Expressão
	2	1	2	1	2	1	2	1
31	3,90	0,324	1,68	0,541	1,78	0,876	2,69	0,378
32	2,50	0,179	1,70	0,509	1,49	0,641	3,48	0,401
34	-	-	1,67	0,512	1,23	1,182	-	-
35	4,25	0,045	2,55	0,487	2,63	0,448	5,47	0,946
36	2,37	0,071	2,41	0,064	3,12	0,448	6,81	7,376
37	3,79	0,362	-	-	15,62	0,448	-	-
38	3,11	0,138	1,91	0,298	2,56	0,448	4,78	1,128
40	4,85	0,081	-	-	3,51	0,601	7,25	0,770
41	3,23	0,033	2,36	0,139	2,64	0,769	-	-
42	4,91	0,416	2,91	1,718	15,25	3,313	38,07	1,116
43	3,60	0,259	2,21	1,727	2,45	1,202	5,48	0,369
45	-	-	1,85	0,189	1,87	2,375	2,68	16,847
46	2,96	0,262	3,68	0,080	-	-	4,74	0,931
47	2,74	0,194	3,23	1,081	1,59	1,407	4,90	0,164
48	4,40	0,185	2,64	0,987	2,37	1,010	2,42	0,132
49	2,77	0,394	1,58	0,157	-	-	1,93	0,198
50	2,34	0,209	1,53	0,170	0,97	0,832	1,66	0,577
52	-	-	-	-	-	-	3,19	0,698
média±DP	3,448±0,872	0,210±0,125	2,261±0,651	0,577±0,557	3,939±4,720	1,067±0,803	6,370±8,936	2,135±4,441
b±s(b)	0,018±0,040	t=0,450; P>0,60	0,240±0,228	t=1,053; P>0,30	0,061±0,044	t=1,386; P>0,10	0,033±0,138	t=0,239; P>0,80

média±DP : média da somatória dos valores de cada gene das amostras LN- e LN+, b±s(b): da somatória dos valores de cada gene das amostras LN- e LN+.

Tabela 5: Número de cópias e valores de expressão dos genes *FOSL1*, *GSTP1*, *FADD* e *CCND1* de 13 pacientes com metástases em linfonodos axilares, com as respectivas médias e valores dos coeficientes de regressão e das médias e coeficientes de regressão da somatória das amostras LN- e LN+.

Genes	<i>FOSL1</i>		<i>GSTP1</i>		<i>FADD</i>		<i>CCND1</i>	
Amostra	Número de cópias	Expressão	Número de cópias	Expressão	Número de cópias	Expressão	Número de cópias	Expressão
	2	1	2	1		1	2	1
57	1,87	0,172	1,66	2,861	1,32	1,126	3,74	0,353
62	3,47	0,081	1,85	0,166	2,20	0,204	5,33	0,535
63	2,38	0,071	1,67	0,069	1,72	0,615	8,74	0,657
64	3,35	0,151	2,23	0,128	5,98	1,605	11,51	1,118
66	-	-	2,61	0,093	2,78	0,735	9,02	0,853
69	-	-	1,94	0,161	1,98	0,869	4,50	3,735
70	-	-	-	-	-	-	2,06	0,849
71	-	-	6,08	0,143	7,36	3,092	7,38	8,821
73	4,42	0,064	2,07	5,877	1,79	0,435	2,00	0,154
74	2,47	0,167	1,65	0,261	1,64	0,172	2,83	0,092
75	1,33	0,161	1,41	0,301	5,36	3,944	6,43	0,189
76	-	-	2,44	1,092	-	-	3,00	1,376
84	4,12	0,327	1,92	0,880	0,99	2,613	1,73	0,127
média±DP	2,926±1,089	0,149±0,085	2,294±1,242	1,003±1,729	3,011±2,168	1,401±1,270	5,252±3,141	1,451±2,414
média±DP *	3,267±0,962	0,189±0,115	2,276±0,938	0,766±1,216	3,546±3,817	1,208±1,017	5,851±6,791	1,818±3,596
b±s(b)	0,005±0,031	t=0,161; P>0,80	0,198±0,464	t=0,427; P>0,60	0,372±0,151	t=2,464; P<0,05	0,179±0,225	t=0,796; P>0,40
b±s(b)*	0,019±0,025	t=0,760; P>0,40	-0,080±0,258	t=0,310; P>0,70	0,095±0,051	t=1,863; P>0,05	-0,008±0,104	t =0,077; P>0,90

média±DP*: média da somatória dos valores de cada gene das amostras LN- e LN+, b±s(b)*: da somatória dos valores de cada gene das amostras LN- e LN+.

6.3 Associação com parâmetros histopatológicos

Alterações do número de cópias do DNA foram analisadas nos seguintes parâmetros histopatológicos: tamanho, grau e estágio do tumor, expressão da proteína ERBB2, expressão do receptor de estrogênio (RE) e do receptor de progesterona (RP).

6.3.1 Tamanho do tumor

As médias dos tamanhos (em cm) dos tumores em cada alteração (perda, normal e ganho) em cada gene das amostras de pacientes LN- e LN+ estão apresentadas na Tabela 6. As diferenças entre as médias de LN- e LN+ e entre os cinco genes foram avaliadas pelo teste de Fisher. O teste de Bartlett demonstrou que as variâncias são homogêneas ($\chi^2_{(4)corr.}=2,96$; $P>0,50$).

Os valores de F são significantes (a 0,05) entre as amostras de pacientes LN- e LN+ (61,86), entre todos os grupos (6,95), mas não entre genes (0,12) e para a interação (0,05). Entre pacientes, o teste t de Student foi igual a $t'=4,10 > t_c=2,00$. Apesar da não significância entre genes e para a interação, observa-se que as médias nos cinco genes da amostra de pacientes LN+ são maiores do que as de pacientes LN-, algumas com diferenças importantes. Pimentel Gomes (1976) refere-se, na página 40: “É interessante que, embora raramente, pode acontecer às vezes que, embora o teste F não tenha sido significativo na análise da variância, obtenha-se um ou mais contrastes significativos pelo teste de Tukey”. Realmente, o teste Tukey (com uma variância residual de 3,08) indicou diferenças significantes entre as médias do tamanho dos tumores de todos os cinco genes das amostras das pacientes LN+ quando comparadas com as LN- (Tabela 7).

Além disso, as diferenças entre as médias dos tamanhos dos tumores observadas nas alterações de número de cópias do DNA (perda, normal e ganho) nos cinco genes das amostras de pacientes LN- e LN+ foram testadas pelo teste de Fisher. O teste de Bartlett mostrou que as variâncias são homogêneas ($\chi^2_{(2)corr.}=3,10$; $P>0,20$). Os valores de F são estatisticamente significantes (a 0,05) entre as amostras de pacientes LN- e LN+ (59,64), entre todos os grupos (17,75), para

interação (13,25), mas não entre as alterações (1,31). Apesar da diferença não significativa entre as alterações, o resultado da interação indica que as médias dos tamanhos dos tumores das alterações de um ou mais genes das amostras de pacientes LN- e LN+ são estatisticamente significantes.

O teste de Tukey (com variância residual de 3,18) indicou diferenças significativas do tamanho do tumor entre as médias das seguintes alterações, nos seguintes genes: *FOSL1*: Ganho em LN+, comparada com ganho ($\Delta=1,581<2,120$) e normal em LN- ($\Delta=1,588<1,680$); perda em LN+ comparada com ganho em LN- ($\Delta=1,437<1,484$). Gene *GSTP1*: normal em LN+ comparada com normal em LN- ($\Delta=1,071<1,212$). Gene *NTSR1*: ganho em LN+ comparada com ganho ($\Delta=0,862<1,120$) e normal em LN- ($\Delta=1,624<1,797$) e gene *CCND1*: ganho em LN+ comparada com ganho em LN- ($\Delta=0,729<1,118$).

A distribuição dos tumores nas pacientes LN- e LN+, de acordo com a classificação TNM, é apresentada no Apêndice 5. Observa-se que os tumores T1, T2 e T3 não se distribuíram igualmente nas duas amostras ($\chi^2_2=9,26$; $P<0,01$). As principais diferenças foram devidas a menor e maior frequências observadas (1 e 13) dos tumores T3, respectivamente em LN- e LN+, comparadas com as frequências esperadas (5,82 e 8,18). Os valores parciais do χ^2 destas duas classes representaram 74% (6,85/9,26) do valor do χ^2 total. Este resultado está de acordo com os acima apresentados, obtidos pela análise quantitativa.

6.3.2 Grau do tumor

Nas amostras LN- e LN+, 94,34% (50/53) e 85,71% (72/84), das pacientes foram informativas. As informações sobre o grau dos tumores (de acordo com a classificação TNM) são apresentadas na Tabela 8.

Em todos os genes e nas duas amostras os tumores com grau II foram mais frequentes e os com grau I menos frequentes. Considerando o total de pacientes informativas em cada gene, os tumores de grau II foram mais frequentes em ambas as amostras nos genes *FOSL1* e *GSTP1* com número de cópias normal e nos genes *NTSR1*, *FADD* e *CCND1* com ganho de número de cópias. Tumores com grau I

foram observados em somente duas pacientes da amostra LN- e em três da amostra LN+, com perda do número de cópias. Assim, em todos os genes das duas amostras os tumores com grau I e II e com perdas e ganhos foram considerados em conjunto para as análises estatísticas. O teste exato de Fisher não indicou diferença estatisticamente significativa para nenhum dos cinco genes tanto para a amostra LN- como para a LN+ (Tabela 8). Também, no total dos cinco genes, os tumores com graus I, II e III se distribuíram igualmente, conforme os valores do teste do χ^2 , em perdas, normal e ganhos de número de cópias, tanto na amostra de pacientes LN- como LN+.

As comparações de perdas, normal e ganhos do número de cópias nos tumores de graus I, II e III de cada gene entre as amostras LN- e LN+, utilizando o teste exato de Fisher e o do qui ao quadrado, não indicaram diferenças estatisticamente significantes de distribuição do grau do tumor, mas no total dos cinco genes as diferenças foram significantes para o número de cópias normal ($\chi^2_2=11,63$; $P<0,01$) e para ganho ($\chi^2_2=10,44$; $P<0,01$), mas não para perda ($\chi^2_1=2,50$; $P>0,10$). Os tumores de graus I, II e III distribuíram-se igualmente em cada gene nas amostras LN- e LN+, mas não no total dos cinco genes ($\chi^2_2=22,54$; $P<0,01$). A diferença foi devida principalmente ao maior número de tumores de grau I (50) em LN- e menor (28) em LN+, quando comparado com o esperado (31,68 e 46,31, respectivamente). O χ^2 parcial destas duas classes representou 79% do χ^2 total (17,82/22,54). Os tumores de graus I, II e III (Apêndice 5) distribuíram-se igualmente nas 51 pacientes LN- e nas 72 LN+ ($\chi^2_2=4,88$; $P>0,05$).

6.3.3 Estágio do tumor

Nas amostras LN- e LN+, 92,5% (49/53) e 81% (68/84) das pacientes foram informativas. As informações sobre o estágio dos tumores (de acordo com a classificação TNM) são apresentadas na Tabela 9.

Em todos os genes de ambas as amostras os tumores no estágio 2 foram mais frequentes e os tumores no estágio 3 e 4 nas pacientes LN- e no estágio 1 nas pacientes LN+ foram menos frequentes. Nos genes *NTSR1*, *FADD* e *CCND1* das pacientes LN- e LN+ os tumores no estágio 2 foram mais frequentes nos casos com

ganho de número de cópias, o mesmo ocorrendo com o gene *FOSL1* nas pacientes LN-, nas quais o gene *GSTP1* apresentou uma maior frequência do estágio 2 nos casos com número de cópias normal, observando-se o mesmo nos genes *FOSL1* e *GSTP1* nas pacientes LN+.

Considerando o menor número e mesmo a ausência de tumores nos estágios 3 e 4 nas pacientes LN- e no estágio 1 nas LN+ com perdas do número de cópias, os casos com estágios 1+2 e 3+4 e com perdas e ganhos foram considerados em conjunto em todos os genes nas duas amostras para as análises estatísticas.

O teste exato de Fisher não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos de pacientes nos cinco genes e no total dos mesmos, neste avaliado pelo teste do χ^2 . Considerando perdas, normal e ganhos de número de cópias isoladamente e comparando-os, através do teste exato de Fisher, entre as amostras LN- e LN+, diferenças significativas foram observadas em ganhos nos genes *FOSL1* ($P=0,0001$), *NTSR1* ($P=0,0008$) e *CCND1* ($P=0,007$) e número de cópias normal nos genes *GSTP1* ($P=0,04$) e *FADD* ($P=0,01$) e ainda para o total de ganhos ($\chi^2_1=37,68$; $P<0,001$) e número de cópias normal ($\chi^2_1=13,53$; $P<0,001$), mas não para perdas ($\chi^2_1=2,60$; $P>0,10$).

Também, as frequências de tumores nos estágios 1+2 e 3+4 não se distribuíram igualmente entre as amostras de pacientes LN- e LN+ nos cinco genes e no total dos mesmos ($\chi^2_1=53,75$; $P<0,001$).

Em todos os resultados estatisticamente significantes acima descritos as principais diferenças foram devidas a menor e maior frequências de tumores nos estágios 3+4, respectivamente em LN- e LN+. Nas avaliações pelo teste do χ^2 , os valores parciais destas duas classes sempre representaram cerca de 70% do valor do χ^2 total.

Os tumores nos estágios 1, 2, 3 e 4 (Apêndice 5) não se distribuíram igualmente nas 50 pacientes LN- e 68 pacientes LN+ ($\chi^2_3=18,34$; $P<0,001$). As principais diferenças foram devidas a maior e menor frequências observadas (20 e 8) dos tumores no estágio 1, respectivamente em LN- e LN+, ocorrendo o inverso nos tumores no estágio 4 (3 e 17), quando comparadas com as frequências esperadas (11,86; 16,14; 8,48 e 11,53, respectivamente). Nas avaliações pelo teste do χ^2 , os valores parciais destas quatro classes representaram cerca de 86% do valor do χ^2 total.

6.3.4 Amplificação de ERBB2

Para a expressão da proteína ERBB2 (analisada por imuno-histoquímica), 75,47% (40/53) das pacientes LN- e 59,52 (50/84) das LN+ foram informativas.

Em todos os genes das pacientes LN- e LN+, ERBB2 negativo foi mais frequente do que ERBB2 positivo (Tabela 10). Considerando o menor número de casos com perdas de número de cópias nos dois grupos (com exceção para o gene *FOSL1* em LN+), perdas e ganhos foram considerados em conjunto para as análises estatísticas em todos os genes dos dois grupos de pacientes. Para quatro genes, ERBB2 negativo foi mais frequente tanto nas pacientes LN- como nas LN+ com alterações do número de cópias (perdas+ganhos). O mesmo tendo sido observado para o gene *FOSL1* com número de cópias normal. O teste exato de Fisher não demonstrou diferenças significativas nas duas amostras entre ERBB2 positivo e negativo e o número de cópias normal e com alterações nos cinco genes analisados e no total dos mesmos, neste avaliado pelo teste do χ^2 . As comparações de casos tanto com número de cópias normal como com alterações (perdas+ganhos) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em ERBB2 positivo e negativo de cada gene e do total dos cinco genes entre as amostras de pacientes LN- e LN+, avaliadas pelos teste exato de Fisher e do χ^2 . Os tumores ERBB2 positivos e negativos (Apêndice 5) se distribuíram igualmente nas 41 pacientes LN- e nas 50 pacientes LN+ ($\chi^2_1=0,15$; $P>0,70$).

6.3.5 Expressão do receptor de estrogênio

Para a expressão do receptor de estrogênio (RE), 79,25% (42/53) das pacientes LN- e 67,86% (57/84) das pacientes LN+ foram informativas.

Em todos os genes de ambas as amostras, RE positivo foi mais frequente do que RE negativo (Tabela 11). Considerando o baixo número de casos com perdas nos dois grupos de pacientes (exceção para o gene *FOSL1* em LN+), perdas e ganhos de número de cópias em todos os genes das duas amostras foram considerados em conjunto nas análises estatísticas.

Em quatro genes, RE positivo apresentou maior frequência em LN- e LN+ com alterações (perdas+ganhos) de número de cópias, enquanto que no gene *GSTP1* a maior frequência foi observada em ambas as amostras com número de cópias normal.

O teste exato de Fisher não demonstrou diferenças estatisticamente significantes entre a distribuição dos tumores RE- e RE+ em cada um dos cinco genes e no total dos mesmos (este avaliado pelo teste do χ^2) tanto nas pacientes LN- como nas LN+. As comparações dos casos com alterações e com número de cópias normal em ER positivo e negativo entre LN- e LN+ não apresentou diferenças estatisticamente significantes, pelo teste exato de Fisher, nos cinco genes analisados. O mesmo acontecendo com o total dos cinco genes nos casos com número de cópias normal, mas não com as alterações ($\chi^2_1=11,08$; $P<0,001$). A diferença foi principalmente devida à menor (23) frequência observada de RE negativos em LN- e maior (63) em LN+ quando comparadas com as esperadas (35,95 e 50,05, respectivamente). O χ^2 parcial destas duas classes representou 72% do valor do χ^2 total (8,01/11,08). Os tumores RE positivos e negativos (Apêndice 5) apresentaram-se igualmente distribuídos nas 42 pacientes LN- e 57 pacientes LN+ ($\chi^2_1=1,50$; $P>0,20$).

6.3.6 Expressão do receptor de progesterona

Para a expressão do receptor de progesterona (RP) 81,13% (43/53) das pacientes LN- e 60,71% (51/84) das LN+ foram informativas.

Em todos os genes de ambas as amostras, RP positivo foi mais frequente do que RP negativo (Tabela 12). Considerando o baixo número de casos com perda em ambos os grupos de pacientes, perdas e ganhos de número de cópias foram considerados em conjunto nas análises estatísticas.

Para quatro genes, RP positivo foi mais frequente, tanto em LN- como em LN+, nos casos com alterações (perdas+ganhos) de número de cópias. Somente no gene *GSTP1*, RP positivo foi mais frequente, nas duas amostras, com número de cópias normal. O teste exato de Fisher não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre as distribuições dos tumores RP positivo e RP negativo em cada

um dos cinco genes e no total dos mesmos (este avaliado pelo teste do χ^2) tanto nas pacientes LN- como nas LN+.

As comparações dos casos com alterações e com número de cópias normal em PR positivo e negativo de cada gene entre LN- e LN+ não demonstrou resultados estatisticamente significantes, avaliados pelo teste exato de Fisher. No entanto, o mesmo não foi observado para o total dos cinco genes com alterações de número de cópias ($\chi^2_1=10,32$; $P<0,01$) e com número de cópias normal ($\chi^2_1=5,51$; $P<0,05$).

As diferenças foram principalmente devidas ao menor número casos PR-negativo observados (29 e 13) em LN- e maior (65 e 27) em LN+, respectivamente para alterações e para número de cópias normal, quando comparados com os esperados: 41,81; 19,31; 52,19 e 20,69, respectivamente. O χ^2 parcial destas duas classes representou aproximadamente 70% do valor do χ^2 total (7,09/10,32 e 3,98/5,51, respectivamente para alterações e para número de cópias normal). Os tumores RP-positivos e RP-negativos (Apêndice 5) apresentaram-se igualmente distribuídos nas 44 pacientes LN- e 51 pacientes LN+ ($\chi^2_1=2,35$; $P>0,10$).

6.3.7 Evolução clínica

Os dados sobre a evolução clínica das pacientes LN- e LN+ são apresentados nos Apêndices 1 e 2, respectivamente. No primeiro grupo, 81% (68/84) das pacientes foram informativas e 91% (48/53) das pacientes do segundo grupo.

Das pacientes LN+, 46% (31/68) foram a óbito, com uma média de sobrevida de $55,95\pm 36,09$ meses após o diagnóstico, obtida de 68% (21/31) dessas pacientes. Neste grupo, 54% (37/68) permaneciam vivas em março de 2015, com sobrevida média de $87,65\pm 45,72$ meses após o diagnóstico. A diferença entre as médias é estatisticamente significativa ($t=2,478$; $P<0,05$). Observa-se que das pacientes que foram a óbito, 22,6% (7/31) desenvolveram metástases à distância: duas no sistema nervoso central, duas disseminadas, uma no ovário, uma hepática e uma peritoneal.

Das pacientes vivas, 78% (29/37) permaneciam sem evidência de doença e 22% com doença em março de 2015 ou na data da última consulta (8/37 - 4 na data

da última consulta e 4 vivas com doença), cinco delas com metástases ósseas, uma com metástases disseminadas e duas sem informação.

Em média, ao diagnóstico, a idade das pacientes que foram a óbito, $57,31 \pm 12,48$ anos, foi superior a das pacientes que permaneciam vivas, $52,49 \pm 14,93$ anos, sem que a diferença seja estatisticamente significativa ($t=1,426$; $P>0,10$).

Das 48 pacientes LN-, 4% (2/48) foram a óbito e 96% (46/48) permaneciam vivas em março de 2015. Obteve-se informação da sobrevida de apenas uma das pacientes que foi a óbito, o que ocorreu 84 meses após o diagnóstico com metástases no sistema nervoso central. Das 46 pacientes vivas, 80% (37/46) permaneciam sem evidência de doença em março de 2015, 13% (6/46) na data da última consulta e 7% desenvolveram metástases hepática, cutânea e no sistema nervoso central.

Estas 46 pacientes apresentaram uma sobrevida média de $71,37 \pm 50,99$ meses após o diagnóstico. Esta média não apresentou diferenças estatisticamente significantes das médias de sobrevida das pacientes com metástases nos linfonodos axilares, tanto das que permaneciam vivas ($87,65 \pm 45,72$ meses - $t=1,494$; $P>0,10$) quanto das que foram a óbito ($55,95 \pm 36,09$ meses - $t=1,346$; $P>0,10$).

As 46 pacientes LN- apresentaram uma idade média de $57,31 \pm 13,65$ anos ao diagnóstico, igual à das pacientes LN+ e que foram a óbito e maior do que a do mesmo grupo que permaneciam vivas ($52,49 \pm 14,93$ anos), sem diferença estatisticamente significativa ($t=1,516$; $P>0,10$). Como o esperado, os números de pacientes que foram a óbito (31 e 2) e que permaneciam vivas (37 e 46) não se distribuíram igualmente nas pacientes com e sem metástases nos linfonodos axilares ($\chi^2_1=23,736$; $P<0,001$). A diferença foi devida principalmente ao maior número de óbitos nas pacientes com metástases e menor nas sem metástases, relativamente aos esperados (19,34 e 13,66), com o χ^2 parcial destas duas classes representando 72% do valor do total (16,983/23,736).

A ocorrência de óbitos não se apresentou associada às alterações do número de cópias de DNA, já que a distribuição de perdas, normal e ganhos no total dos cinco genes analisados distribuiu-se igualmente tanto nas pacientes que foram a óbito como nas vivas LN+ ($\chi^2_2=3,04$; $P>0,20$) e LN- ($\chi^2_2=1,41$; $P>0,30$).

Tabela 6: Médias do tamanho do tumor (em cm) de acordo com as alterações do número de cópias de DNA dos genes *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD* e *CCND1* nas amostras LN- e LN+.

		<i>FOSL1</i>	<i>GSTP1</i>	<i>NTSR1</i>	<i>FADD</i>	<i>CCND1</i>	TOTAL
LN -	Perda	3,330±1,456 (10)	3,125±2,250 (4)	0,000	1,750±1,190 (4)	0,000	2,933±1,643 (18)
	Normal	2,800±1,224 (17)	2,582±1,153 (33)	2,111±1,516 (9)	2,821±1,438 (14)	2,100±0,894 (5)	2,587±1,294 (78)
	Ganho	2,360±0,902 (20)	2,733±1,062 (12)	2,788±1,168 (41)	2,686±1,107 (28)	2,650±1,200 (40)	2,700±1,122 (141)
	Total	2,725±1,188 (47)	2,640±1,217 (50)	2,613±1,220 (51)	2,646±1,228 (46)	2,609±1,170 (46)	2,592±1,217 (52)
LN +	Perda	3,844±1,971 (25)	3,600±1,534 (7)	0,000	4,700±2,370 (7)	0,000	3,954±1,960 (39)
	Normal	3,475±2,422 (24)	3,794±2,262 (50)	3,640±3,211 (10)	3,556±1,979 (16)	4,160±2,303 (5)	3,688±2,324 (105)
	Ganho	4,480±2,053 (20)	3,857±2,040 (14)	3,908±1,976 (60)	3,705±1,775 (42)	3,768±2,219 (60)	3,877±2,017 (196)
	Total	3,894±2,420 (69)	3,832±2,154 (72)	3,870±2,167 (70)	3,688±1,760 (66)	3,834±2,181 (67)	3,848±2,143 (73)

LN-: pacientes sem metástases nos linfonodos axilares, LN+: pacientes com metástases nos linfonodos axilares.

Tabela 7: Resultados do teste de Tukey (Δ), indicando as diferenças estatisticamente significativas a 0,05, entre as médias {m+(-)m-} dos tamanhos dos tumores dos genes da amostra de pacientes LN+ quando comparadas com as de LN-.

LN+					
LN-	Δ {m+(-)m-}				
Genes	<i>FOSL1</i>	<i>GSTP1</i>	<i>NTSR1</i>	<i>FADD</i>	<i>CCND1</i>
<i>FOSL1</i>	0,950<1,169	0,781<1,107	0,911<1,145	0,663<0,963	0,868<1,109
<i>GSTP1</i>	0,997<1,254	0,897<1,192	0,969<1,230	0,856<1,048	0,951<1,194
<i>NTSR1</i>	1,021<1,281	0,937<1,219	0,997<1,257	0,911<1,075	0,984<1,221
<i>FADD</i>	0,998<1,248	0,844<1,186	0,964<1,224	0,803<1,042	0,936<1,188
<i>CCND1</i>	1,069<1,285	0,998<1,223	1,050<1,261	0,977<1,079	1,040<1,225

LN-: pacientes sem metástases nos linfonodos axilares, LN+: pacientes com metástases nos linfonodos axilares.

Tabela 8: Distribuição das alterações de número de cópias dos genes *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD* e *CCND1* nos tumores de graus I, II e III nas amostras de pacientes LN- e LN+.

	Grau	<i>FOSL1</i>				<i>GSTP1</i>				<i>NTSR1</i>			
		I n (%)	II n (%)	III n (%)	Total n	I n (%)	II n (%)	III n (%)	Total n	I n (%)	II n (%)	III n (%)	Total n
LN -	Perda	0 (0,00)	9 (36,00)	1 (8,33)	10	0 (0,00)	2 (8,00)	2 (15,38)	4	0 (0)	0 (0,00)	0 (0,00)	0
	Normal	5 (55,56)	9 (36,00)	4 (33,33)	18	9 (81,82)	17 (68,00)	8 (61,54)	34	5 (45,45)	1 (3,85)	2 (15,38)	8
	Ganho	4 (44,44)	7 (28,00)	7 (58,33)	18	2 (18,18)	6 (24,00)	3 (23,08)	11	6 (54,55)	25 (96,15)	11 (84,62)	42
	Total	9 (19,56)	25 (54,35)	12 (26,09)	46	11 (22,45)	25 (51,02)	13 (26,53)	49	11 (22,00)	26 (52,00)	13 (26,00)	50
T.E.F. P = 0,74					T.E.F. P = 0,50					T.E.F. P = 1,0			
LN+	Perda	2 (33,33)	13 (33,33)	9 (36,00)	24	0 (0,00)	4 (10,00)	3 (11,54)	7	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0
	Normal	2 (33,33)	15 (38,46)	10 (40,00)	27	5 (83,33)	29 (72,50)	15 (57,69)	49	1 (16,67)	6 (15,00)	3 (12,00)	10
	Ganho	2 (33,33)	11 (28,21)	6 (24,00)	19	1 (16,67)	7 (17,50)	8 (30,77)	16	5 (83,33)	34 (85,00)	22 (88,00)	61
	Total	6 (8,57)	39 (55,71)	25 (35,72)	70	6 (8,33)	40 (55,56)	26 (36,11)	72	6 (8,45)	40 (56,33)	25 (35,21)	71
T.E.F. P = 1,0					T.E.F. P = 0,19					T.E.F. P = 1,0			

Continuação da tabela 8.

	Grau	<i>FADD</i>				<i>CCND1</i>				TOTAL GERAL			
		I n (%)	II n (%)	III n (%)	Total n	I n (%)	II n (%)	III n (%)	Total n	I n (%)	II n (%)	III n (%)	Total n
LN -	Perda	2 (20,00)	3 (13,64)	0 (0,00)	5	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0	2 (4,00)	14 (11,38)	3 (4,92)	19
	Normal	1 (10,00)	7 (31,82)	4 (30,77)	12	1 (11,11)	3 (12,00)	1 (10,00)	5	21 (42,00)	37 (30,08)	19 (31,15)	77
	Ganho	7 (70,00)	12 (54,55)	9 (69,23)	28	8 (88,89)	22 (88,00)	9 (90,00)	39	27 (54,00)	72 (58,54)	39 (63,93)	138
	Total	10 (22,22)	22 (48,89)	13 (28,89)	45	9 (20,45)	25 (56,82)	10 (22,73)	44	50 (21,37)	123 (52,56)	61 (26,07)	234
T.E.F. P= 0,72					T.E.F. P = 1,0					$\chi^2_4=5,55$; P>0,20			
LN+	Perda	1 (20,00)	4 (11,11)	2 (8,70)	7	0 (0,00)	1 (2,86)	0 (0,00)	1	3 (10,72)	22 (11,58)	14 (11,29)	39
	Normal	1 (20,00)	8 (22,22)	6 (26,09)	15	0 (0,00)	3 (8,57)	2 (8,00)	5	9 (32,14)	61 (32,10)	36 (29,03)	106
	Ganho	3 (60,00)	24 (66,67)	15 (65,22)	42	5 (100)	31 (88,57)	23 (92,00)	59	16 (57,14)	107 (56,32)	74 (59,68)	197
	Total	5 (7,81)	36 (56,25)	23 (35,94)	64	5 (7,69)	35 (53,85)	25 (38,46)	65	28 (8,19)	190 (55,55)	124 (36,25)	342
T.E.F. P = 0,76					T.E.F. P = 1,0					$\chi^2_4= 0,40$; P>0,95			

LN-: pacientes sem metástases nos linfonodos axilares, LN+: pacientes com metástases nos linfonodos axilares, n: tamanho amostral, T.E.F.: Teste exato de Fisher.

Tabela 9: Distribuição das alterações de número de cópias dos genes *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD* e *CCND1* nos tumores de estágios 1, 2, 3 e 4 nas amostras de pacientes LN- e LN+.

	Estágio	<i>FOSL1</i>					<i>GSTP1</i>					<i>NTSR1</i>				
		1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)	4 n (%)	Total n	1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)	4 n (%)	Total n	1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)	4 n (%)	Total n
LN-	Perda	2 (12,50)	4 (17,39)	2 (66,67)	1 (33,33)	9	0 (0,00)	2 (8,33)	1 (33,33)	1 (33,33)	4	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0
	Normal	7 (43,75)	7 (30,43)	1 (33,33)	2 (66,67)	17	15 (83,33)	15 (62,50)	1 (33,33)	2 (66,67)	33	6 (31,58)	2 (8,33)	0 (0,00)	1 (33,33)	9
	Ganho	7 (43,75)	12 (52,17)	0 (0,00)	0 (0,00)	19	3 (16,67)	7 (29,17)	1 (33,33)	0 (0,00)	11	13 (68,42)	22 (91,67)	3 (100)	2 (66,67)	40
	Total	16 (35,55)	23 (51,11)	3 (6,67)	3 (6,67)	45	18 (37,50)	24 (50,00)	3 (6,25)	3 (6,25)	48	19 (38,78)	24 (48,98)	3 (6,12)	3 (6,12)	49
T.E.F. P = 0,66							T.E.F. P = 0,36					T.E.F. P = 1,0				
LN+	Perda	4 (66,67)	8 (28,57)	4 (36,36)	7 (41,18)	23	1 (14,29)	2 (6,06)	1 (11,11)	3 (15,79)	7	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0
	Normal	2 (33,33)	15 (53,57)	3 (27,27)	3 (17,65)	23	6 (85,71)	22 (66,67)	7 (77,78)	11 (57,89)	46	1 (14,29)	6 (19,35)	1 (9,09)	1 (5,88)	9
	Ganho	0 (0,00)	5 (17,86)	4 (36,36)	7 (41,18)	16	0 (0,00)	9 (27,27)	1 (11,11)	5 (26,32)	15	6 (85,71)	25 (80,65)	10 (90,91)	16 (94,12)	57
	Total	6 (9,68)	28 (45,16)	11 (17,74)	17 (27,42)	62	7 (10,29)	33 (48,53)	9 (13,24)	19 (27,94)	68	7 (10,60)	31 (46,97)	11 (16,67)	17 (25,76)	66
T.E.F. P = 0,07							T.E.F. P = 0,79					T.E.F. P = 0,28				

Continuação da tabela 9.

	FADD										CCND1										Total Geral			
	Estágio	1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)	4 n (%)	Total n	1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)	4 n (%)	Total n		1+2 n (%)	3+4 n (%)	Total n									
LN-	Perda	3 (18,75)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (33,33)	4	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0	Normal	69 (34,33)	9 (32,14)	78									
	Normal	2 (12,50)	11 (47,83)	1 (50,00)	0 (0,00)	14	2 (11,76)	2 (9,52)	0 (0,00)	1 (33,33)	5	Perda + Ganho	132 (65,67)	19 (67,86)	151									
	Ganho	11 (68,75)	12 (52,17)	1 (50,00)	2 (66,67)	26	15 (88,24)	19 (90,48)	2 (100)	2 (66,67)	38													
	Total	16 (36,36)	23 (52,27)	2 (4,55)	3 (6,82)	44	17 (39,53)	21 (48,84)	2 (4,65)	3 (6,98)	43		Total	201(87,77)	28 (12,23)	229								
	T.E.F. P = 1,0						T.E.F. P = 0,48						χ² ₁ =0,056; P>0,80											
LN+	Perda	1 (16,67)	1 (3,45)	2 (22,22)	3 (17,65)	7	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (7,69)	1	Normal	63(33,16)	35 (26,52)	98									
	Normal	4 (66,67)	3 (10,34)	2 (22,22)	6 (35,29)	15	1 (12,50)	3 (9,68)	1 (11,11)	0 (0,00)	5	Perda + Ganho	127(66,84)	97 (73,48)	224									
	Ganho	1 (16,67)	25 (86,21)	5 (55,56)	8 (47,06)	39	7 (87,50)	28 (90,32)	8 (88,89)	12 (92,31)	55													
	Total	6 (9,84)	29 (47,54)	9 (14,75)	17 (27,87)	61	8 (13,12)	31 (50,82)	9 (14,75)	13 (21,31)	61		Total	190(59,00)	132 (41,00)	322								
	T.E.F. P = 0,38						T.E.F. P = 0,64						χ² ₁ =1,62; P>0,20											

LN-: pacientes sem metástases nos linfonodos axilares, LN+: pacientes com metástases nos linfonodos axilares, n: tamanho amostral, T.E.F.: Teste exato de Fisher.

Tabela 10: Distribuição das alterações de número de cópias dos genes *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD* e *CCND1* nos tumores com e sem amplificação da proteína ERBB2 nas amostras de pacientes LN- e LN+.

	ANÁLISE DO FATOR DE RISCO																			
	FOSL1				GSTP1			NTSR1			FADD			CCND1			TOTAL GERAL			
	ERBB2	+	-	Total	+	-	Total	+	-	Total	+	-	Total	+	-	Total		+	-	Total
		n (%)	n (%)	n	n (%)	n (%)	n	n (%)	n (%)	n	n (%)	n (%)	n	n (%)	n (%)	n		n (%)	n (%)	n
LN-	Perda	3 (21,43)	1 (4,17)	4	3 (21,43)	0 (0,00)	3	0 (0,00)	0 (0,00)	0	2 (14,29)	2 (8,79)	4	0 (0,00)	0 (0,00)	0	Normal	25 (37,31)	44 (35,77)	69
	Normal	8 (57,14)	9 (37,50)	17	11 (78,57)	18 (72,00)	29	3 (21,43)	3 (11,54)	6	3 (21,43)	10 (43,48)	13	0 (0,00)	4 (16,00)	4	Perda+ Ganho	42 (62,69)	9 (37,50)	121
	Ganho	3 (21,43)	14 (58,33)	17	0 (0,00)	7 (28,00)	7	11 (78,57)	23 (88,46)	34	9 (64,29)	11 (47,83)	20	11 (100)	21 (84,00)	32				
	Total	14 (36,84)	24 (63,16)	38	14 (35,90)	25 (64,10)	39	14 (35,00)	26 (65,00)	40	14 (37,84)	23 (62,16)	37	11 (30,56)	25 (69,44)	36	Total	67 (35,26)	123 (64,74)	190
			T.E.F. P = 0,32			T.E.F. P = 0,72			T.E.F. P = 0,65			T.E.F. P = 0,29			T.E.F. P = 0,29				$\chi^2_1=0,045$; P>0,80	
LN +	Perda	8 (44,44)	9 (29,03)	17	1 (5,26)	3 (9,68)	4	0 (0,00)	0 (0,00)	0	2 (11,76)	5 (17,86)	7	0 (0,00)	0 (0,00)	0	Normal	26 (29,21)	45 (30,20)	71
	Normal	4 (22,22)	13 (41,94)	17	13 (68,42)	22 (70,97)	35	4 (22,22)	3 (9,68)	7	3 (17,65)	6 (21,43)	9	2 (11,76)	1 (3,57)	3	Perda+ Ganho	63 (70,79)	104 (69,80)	167
	Ganho	6 (33,33)	9 (29,03)	15	5 (26,32)	6 (19,35)	11	14 (77,78)	28 (90,32)	42	12 (70,59)	17 (60,71)	29	15 (88,24)	27 (96,43)	42				
	Total	18 (36,73)	31 (63,27)	49	19 (38,00)	31 (62,00)	50	18 (36,73)	31 (63,27)	49	17 (37,78)	28 (62,22)	45	17 (37,78)	28 (62,22)	45	Total	89 (37,39)	149 (62,61)	238
			T.E.F. P = 0,22			T.E.F. P = 1,0			T.E.F. P = 0,40			T.E.F. P = 1,0			T.E.F. P = 0,55				$\chi^2_1=0,025$; P>0,80	

LN-: pacientes sem metástases nos linfonodos axilares, LN+: pacientes com metástases nos linfonodos axilares, n: tamanho amostral, T.E.F.: Teste exato de Fisher.

Tabela 11: Distribuição das alterações de número de cópias dos genes *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD* e *CCND1* nos tumores com e sem expressão do receptor de estrogênio (RE) nas amostras de pacientes LN- e LN+.

	RE	<i>FOSL1</i>			<i>GSTP1</i>			<i>NTSR1</i>			<i>FADD</i>			<i>CCND1</i>			<i>Total geral</i>		
		+	-	T	+	-	T	+	-	T	+	-	T	+	-	T	+	-	T
		n (%)	n (%)	n	n (%)	n (%)	n	n (%)	n (%)	n	n (%)	n (%)	n	n (%)	n (%)	n	n (%)	n (%)	n
LN-	Perda	5 (41,67)	2 (28,57)	7	3 (8,11)	0 (0,00)	3	0 (0,00)	0 (0,00)	0	5 (16,13)	0 (0,00)	5	0 (0,00)	0 (0,00)	0	13 (8,07)	2 (5,71)	15
	Normal	2 (16,67)	2 (28,57)	4	5 (13,51)	1 (12,50)	6	5 (14,71)	1 (12,50)	6	8 (25,81)	4 (57,14)	12	4 (12,90)	1 (20,00)	5	54 (33,54)	12 (34,29)	66
	Ganho	5 (41,67)	3 (42,86)	8	29 (78,38)	7 (87,50)	36	29 (85,29)	7 (87,50)	36	18 (58,06)	3 (42,86)	21	27 (87,10)	4 (80,00)	31	94 (58,39)	21 (60,00)	115
	Total	12 (63,16)	7 (36,84)	19	37 (82,22)	8 (17,78)	45	34 (80,95)	8 (19,05)	42	31 (81,58)	7 (18,42)	38	31 (86,11)	5 (13,89)	36	161 (82,14)	35 (17,86)	196
		T.E.F. P = 1,0			T.E.F. P = 0,20			T.E.F. P = 1,0			T.E.F. P = 0,17			T.E.F. P = 0,55			$\chi^2=0,23$; P>0,80		
LN+	Perda	12 (30,77)	4 (25,00)	16	3 (7,69)	0 (0,00)	3	0 (0,00)	0 (0,00)	0	3 (8,82)	4 (22,22)	7	0 (0,00)	0 (0,00)	0	18 (9,68)	8 (9,41)	26
	Normal	18 (46,15)	5 (31,25)	23	31 (79,49)	10 (55,56)	41	7 (17,95)	0 (0,00)	7	8 (23,53)	5 (27,78)	13	4 (11,43)	2 (11,76)	6	68 (36,56)	22 (25,88)	90
	Ganho	9 (23,09)	7 (43,75)	16	5 (12,82)	8 (44,44)	13	32 (82,05)	16 (100)	48	23 (67,65)	9 (50,00)	32	31 (88,57)	15 (88,24)	46	100 (53,76)	55 (64,71)	155
	Total	39 (70,91)	16 (20,09)	55	39 (68,42)	18 (31,58)	57	39 (70,91)	16 (29,09)	55	34 (65,38)	18 (34,62)	52	35 (67,31)	17 (32,69)	52	186 (68,63)	85 (31,37)	271
		T.E.F. P = 0,38			T.E.F. P = 0,11			T.E.F. P = 0,09			T.E.F. P = 0,75			T.E.F. P = 1,0			$\chi^2=3,22$; P>0,10		

LN-: pacientes sem metástases nos linfonodos axilares, LN+: pacientes com metástases nos linfonodos axilares, n: tamanho amostral, T; Total; T.E.F.: Teste exato de Fisher.

Tabela 12: Distribuição das alterações de número de cópias dos genes *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD* e *CCND1* nos tumores sem e com expressão do receptor de progesterona (RP) nas amostras de pacientes LN- e LN+.

	RP	<i>FOSL1</i>			<i>GSTP1</i>			<i>NTSR1</i>			<i>FADD</i>			<i>CCND1</i>			<i>Total geral</i>		
		+	-	T	+	-	T	+	-	T	+	-	T	+	-	T	+	-	T
		n (%)	n (%)	n	n (%)	n (%)	n	n (%)	n (%)	n	n (%)	n (%)	n	n (%)	n (%)	n	n (%)	n (%)	n
LN -	Perda	4 (12,12)	1 (14,29)	5	3 (9,09)	0 (0,00)	3	0 (0,00)	0 (0,00)	0	4 (12,90)	1 (11,11)	5	0 (0,00)	0 (0,00)	0	11 (6,83)	2 (4,76)	13
	Normal	14 (42,42)	1 (14,29)	15	25 (75,76)	5 (55,56)	30	6 (17,65)	1 (11,11)	7	9 (29,03)	4 (44,44)	13	3 (10,00)	2 (25,00)	5	57 (35,40)	13 (30,95)	70
	Ganho	15 (45,45)	5 (71,43)	20	5 (15,15)	4 (44,44)	9	28 (82,35)	8 (88,89)	36	18 (58,06)	4 (44,44)	22	27 (90,00)	6 (75,00)	33	93 (57,76)	27 (64,29)	120
	Total	33 (82,50)	7 (17,50)	40	33 (78,57)	9 (21,43)	42	34 (79,07)	9 (20,93)	43	31 (77,50)	9 (22,50)	40	30 (79,85)	8 (21,05)	38	161 (79,31)	42 (20,69)	203
		T.E.F. P = 0,22			T.E.F. P = 0,41			T.E.F. P = 1,0			T.E.F. P = 0,44			T.E.F. P = 0,28			$\chi^2=0,66$; P>0,70		
LN +	Perda	10 (32,26)	6 (33,33)	6	4 (12,50)	0 (0,00)	4	0 (0,00)	0 (0,00)	0	2 (7,41)	4 (22,22)	6	0 (0,00)	0 (0,00)	0	16 (10,74)	10 (10,87)	26
	Normal	11 (35,48)	6 (33,33)	17	22 (68,75)	13 (68,42)	35	5 (15,63)	2 (11,11)	7	7 (25,93)	4 (22,22)	11	3 (11,11)	2 (10,53)	5	48 (32,21)	27 (29,35)	75
	Ganho	10 (32,26)	6 (33,33)	16	6 (18,75)	6 (31,58)	12	27 (84,38)	16 (88,89)	43	18 (66,67)	10 (55,56)	28	24 (88,89)	17 (89,47)	41	85 (57,05)	55 (59,78)	140
	Total	31 (63,27)	18 (36,73)	49	32 (62,75)	19 (37,25)	51	32 (64,00)	18 (36,00)	50	27 (60,00)	18 (40,00)	45	27 (58,70)	19 (41,30)	46	149 (61,83)	92 (38,17)	241
		T.E.F. P = 1,0			T.E.F. P = 1,0			T.E.F. P = 1,0			T.E.F. P = 1,0			T.E.F. P = 1,0			$\chi^2=0,23$; P>0,80		

LN-: pacientes sem metástases nos linfonodos axilares, LN+: pacientes com metástases nos linfonodos axilares, n: tamanho amostral, T: Total; T.E.F.: Teste exato de Fisher.

7. DISCUSSÃO

O câncer de mama é o tipo mais comum de câncer entre as mulheres e o segundo mais frequente na população em geral. Quando é tratado no início de seu desenvolvimento, tem um bom prognóstico. A comunidade científica tem feito grande esforço para identificar biomarcadores capazes de detectar o câncer em seus estágios iniciais e para caracterizar os diferentes tipos da doença. Um dos objetivos é a identificação de tumores iniciais que possuam o potencial de metastatizar e se tornar tumores agressivos, para que os pacientes recebam o melhor tratamento desde o diagnóstico. Desta forma, nós analisamos o número de cópias de DNA de cinco genes e a expressão de quatro deles em duas amostras: tumores de mama primários sem e com metástases nos linfonodos axilares, na tentativa de identificar marcadores presentes no tumor inicial que pudessem indicar um potencial de metastatização e agressividade do tumor.

Os resultados mostram que todos os genes analisados apresentam alterações no número de cópias, sejam ganhos ou perdas, um resultado esperado, uma vez que analisamos genes que codificam proteínas importantes para o sistema de controle do ciclo celular (POLLACK *et al.*, 2002; KALLIONIEMI, 2008; BEROUKHIM *et al.*, 2010). As alterações no número de cópias de DNA são comuns no câncer e podem resultar na expressão e função alteradas de genes que estejam presentes na região afetada do genoma. Acredita-se que esses segmentos do genoma tumoral contenham tanto oncogenes quanto genes supressores de tumor, dependendo se eles estão presentes em número de cópias aumentado ou diminuído. Além da progressão tumoral, a grande quantidade de alterações de número de cópias também está relacionada com um pior prognóstico (KALLIONIEMI, 2008).

O aumento do número de cópias de DNA foi observado em quase todos os genes estudados, porém, nos genes *NTSR1*, *FADD* e *CCND1* as frequências foram superiores a 60% nas duas amostras (LN- e LN+), maiores que aquelas observadas em *FOSL1* e *GSTP1*. Nesses dois genes, os χ^2 parciais foram os principais responsáveis (cerca de 63% do χ^2 total) pela distribuição não-homogênea das alterações de número de cópias nos dois grupos. Por exemplo, na amostra LN+, os

χ^2 parciais em perdas, normal e ganhos de número de cópias nos genes *FOSL1* e *GSTP1*, em conjunto, representaram 63% do valor do χ^2 total (120,55/190,75).

Dos resultados apresentados, destaca-se que não houve diferenças estatisticamente significativas no número de cópias de DNA dos cinco genes analisados nem no total deles entre as amostras LN- e LN+. No entanto, considerando a ocorrência ao acaso de perdas+ganhos e de número de cópias normal, exceto para o gene *FOSL1*, para o qual perdas e ganhos não foram consideradas em conjunto, todas as diferenças foram significativas para os outros quatro genes e para o total de LN- e LN+, sendo que apenas o gene *GSTP1* apresentou número de cópias maior do que o esperado. No geral, esses resultados indicam que o aumento do número de cópias em *NTSR1*, *FADD* e *CCND1* está envolvido na tumorigênese mamária, provavelmente atuando como um fator de iniciação, uma vez que não foram observadas diferenças nas comparações entre tumores primários sem e com metástases axilares.

Os dados descritos por Torresan (2011) ao estudar as alterações de número de cópias de DNA no genoma de metástases de tumor mamário em linfonodos sentinela, comparado com os tumores primários correspondentes, indicam que 90% das 10 alterações mais frequentemente encontradas são comuns ao tumor de mama primário e à metástase no linfonodo sentinela, e que nessas regiões foram observadas principalmente amplificações, o que corrobora os nossos resultados em nível gênico, considerando a maior frequência de ganhos de número de cópias de DNA nos genes *NTSR1*, *FADD* e *CCND1*.

A região 11q13 compreende aproximadamente 14Mb, contém mais de 200 genes e apresenta diversos padrões de ganho de número de cópias, sugerindo mecanismos complexos e pressão de seleção durante a progressão tumoral (HOLM *et al.*, 2012). Esta região contém genes funcionalmente relevantes para o processo de metastatização e de mau prognóstico. Portanto, o entendimento das diversas contribuições desses genes pode ser de importância pelo potencial informativo do desenvolvimento de metástases e sobrevida (SUGAHARA *et al.*, 2011).

Considerando que aproximadamente um em cada seis cânceres de mama primários humanos apresenta amplificação do DNA genômico na banda q13 do braço longo do cromossomo 11 (GILLET *et al.*, 1994; SESHADRI *et al.*, 1996; POLLACK *et al.*, 2002; BOSTNER *et al.*, 2007; PATTJE *et al.*, 2013) e que o gene *FADD* é considerado o impulsor da amplificação nesta região, o ganho

observado no número de cópias de *FADD* e *CCND1* é um resultado esperado. Esta amplificação contribui através de algum mecanismo para o fenótipo das células tumorais e pode ter uma influência significativa no desenvolvimento clínico da doença, havendo, inclusive, indicações de que a presença de amplificação em 11q13 está relacionada com pior prognóstico (GILLET *et al.*, 1994).

Com um desenho semelhante ao do nosso trabalho, Sugahara *et al.* (2011) estudaram materiais obtidos de tumores primários de pacientes com carcinoma de células escamosas da boca com (n=22) e sem (n=22) metástases nos linfonodos cervicais, onde foram observados por CGH ganhos frequentes na região 11q13, exclusivamente em pacientes com metástases nos linfonodos cervicais, confirmando o resultado por experimentos de qPCR em tempo real utilizando 11 genes, incluindo *CCND1* e *FADD*.

Até agora, do nosso conhecimento, não há descrições que relacionem o aumento do número de cópias do gene *FADD* ao câncer de mama, como apresentado neste trabalho, mas já foi observado em tumores de língua e faringe, correlacionando com o nível de expressão gênica (JÄRVINEN *et al.*, 2006, 2008). O primeiro estudo identificou também ganho de número de cópias em *CCND1*, mas não o aumento da sua expressão.

A expressão de *FADD* foi associada ao estágio do tumor (P=0,046) em um estudo com 98 casos de carcinoma ducal invasivo de mama (CHOI *et al.*, 2014).

Por outro lado, o gene *CCND1* tem sido extensivamente descrito como apresentando ganhos de número de cópias e aumento da expressão gênica em casos de câncer de mama. Por exemplo, Seshadri *et al.* (1996) descreveram amplificação do gene *CCND1* em 10% dos 1014 pacientes com câncer de mama estudados. Não foi encontrada associação entre a amplificação de *CCND1* e a idade dos pacientes, tamanho e estágio do tumor, comprometimento dos linfonodos axilares, amplificação de ERBB2, contagem de anticorpos monoclonais MIB-1 contra o antígeno Ki67 nem expressão de p53. A amplificação de *CCND1* foi predominantemente observada em tumores com expressão de receptores hormonais; quando em número de cópias ≤ 3 , significativamente correlacionada tanto com a positividade do receptor de estrogênio (P=0,036) quanto com o de progesterona (P=0,012).

Costner *et al.* (2007) observaram amplificação de *CCND1* em 12,5% da amostra analisada (28/224 tumores de mama), dos quais 93% eram tumores RE-

positivos.

Em um estudo com 94 tumores de mama com amplificação de *CCND1*, dentre tumores esporádicos, hereditários e familiares, e um grupo com 281 tumores de mama sem amplificação de *CCND1* usados para comparação, a maioria dos tumores com amplificação de *CCND1* era RE-positivo e classificada como luminal B. Além disso, foi encontrado que a amplificação de *CCND1* estava associada ao fenótipo mais agressivo, com tumores de grau histológico II e com tumores do subtipo luminal A (HOLM *et al.*, 2012).

A amplificação de *CCND1* foi observada em 28 de 133 (21,05%) carcinomas primários de mama em outro estudo comparando os tumores primários com as metástases correspondentes em linfonodos axilares. A amplificação foi significativamente associada com o alto grau do tumor ($p=0,042$), mas não com o tipo do tumor ($p=0,307$), estágio ($p=0,540$) e expressão de RE ($p=0,061$) ou RP ($p=0,871$). Não foram observadas diferenças de número de cópias entre os 22 tumores primários e as suas metástases em linfonodos. O alto grau de homogeneidade da amplificação de *CCND1* sugere que esta alteração é um evento inicial no desenvolvimento dos tumores mamários (BURANDT *et al.*, 2014).

Em um estudo analisando pacientes com lesões na glândula paratireoide, Zhao *et al.* (2014) mostraram, por MLPA, que a amplificação de *CCND1* era mais prevalente em carcinomas do que em adenomas (71 vs. 21%, $p=0,056$). Além disso, o nível de RNAm de *CCND1* foi significativamente maior em carcinomas do que em adenomas ($p=0,003$), observado por qPCR. Análises de *Western blot* e imuno-histoquímica também demonstraram maior expressão de *CCND1* em amostras de carcinoma do que de adenoma.

Dupouy *et al.* (2009) avaliaram o *status* de NTSR1 como cooperador para a progressão do câncer de mama. A alta expressão de NTSR1 estava associada com o maior tamanho do tumor ($p<0,01$), tumores com grau III ($p<0,05$), o número de linfonodos comprometidos ($p<0,05$), e como consequência, também foi associado com a quimioterapia ($p<0,01$). Os autores também observaram que pacientes com alta expressão de NTSR1 tinham significativamente pior prognóstico do que as com baixa expressão de NTSR1 (taxa de sobrevida de 10 anos de 66,2% vs. 96,5%; $p=0,01$). O risco relativo de óbito em mulheres com expressão de NTSR1 $\geq 80\%$ comparado com o de mulheres com expressão $<80\%$ foi significativamente elevado (RR=5,29, IC 95% [1,04–26,88], $p=0,044$).

Em culturas de células MCF-7, Somaï *et al.* (2002) observaram um aumento de 10 vezes na expressão do RNAm de *NTSR1* comparado com os tecidos periféricos normais, e a ausência do RNAm em células normais do epitélio mamário. Além disso, experimentos de imuno-histoquímica foram realizadas em tecidos de carcinomas mamários e foi observado que a maioria dos pacientes exibiam expressão de *NTSR1* no componente intraductal.

Souazé *et al.* (2006) obtiveram um resultado semelhante, sem expressão de *NTSR1* em células normais, comparado com células MCF-7. Observaram ainda que a reatividade de *NTSR1* nas células tumorais estava restrita ao compartimento intraductal em 59% das pacientes com grau histológico I, comparado com apenas 4% com grau III. Por outro lado, as pacientes com *NTSR1*-positivo no componente invasivo tinham predominantemente grau histológico III (90%), com apenas 36% delas com tumores de grau I. Na linhagem celular humana de câncer mama com alta malignidade MDA-MB-231, os autores observaram o *NTSR1* em diversas funções de transformação, incluindo migração e invasão celular e indução da transcrição de metaloproteinase de matriz (MMP-9). Além disso, foi descrito que a interrupção da sinalização de *NTSR1* pela utilização de RNAi ou o uso de antagonistas específicos de *NTSR1* provocou a reversão destas funções transformantes e do crescimento tumoral em células MDA-MB-231 transplantadas em camundongos *nude*.

As análises de expressão gênica foram conduzidas incluindo quatro genes, *FOSL1*, *GSTP1*, *FADD* e *CCND1*. Como mencionado nos resultados, apenas 18 pacientes LN- e 13 pacientes LN+ puderam ser analisadas. Desta forma, os resultados obtidos devem ser interpretados com cautela uma vez que amostras com pequeno número de casos analisados podem resultar em informações não consistentes.

Dentro deste contexto, deve-se interpretar as diferenças significativas entre as médias dos valores de expressão tanto da amostra LN- como da LN+. Resultados estatisticamente significativos foram observados em comparações com o gene *FOSL1* (com *GSTP1* em LN- e com *FADD* em ambas as amostras), que apresentou uma média de expressão baixa (0,210 em LN- e 0,149 em LN+). Poder-se-ia esperar que houvesse diferenças estatisticamente significativas também em comparações com o gene *CCND1*, já que este apresentou em média os maiores valores de expressão tanto em LN- (2,135) quanto em LN+ (1,451). No entanto, as variâncias

destas médias foram elevadas, o que, em função da formulação matemática do teste de significância, eleva de forma importante o denominador da fórmula utilizada.

O valor significativo de *b* para o gene *FADD* em LN+ deve ser interpretado neste contexto. Em nenhuma das outras análises considerando cada um dos genes e o total dos mesmos, tanto em LN- quanto em LN+, houve indicação de variação de expressão gênica dependente das variações de número de cópias, provavelmente a conclusão mais aceitável, uma vez que ao considerar todos os casos juntos (60 LN- e 44 LN+), o valor de *b* também não foi significativo ($b=0,048\pm0,049$ $t=0,980$; $P>0,30$). Podemos observar nas Tabelas 4 e 5 que as médias dos valores de expressão em LN- e em LN+ e também o somatório dos dois grupos aumentam de *FOSL1* para *CCND1*, sendo menor ou praticamente igual a 1 (*GSTP1* em LN+) em *FOSL1* e *GSTP1*, mais próxima de 1 em *FADD* e com os maiores valores em *CCND1*. Com exceção de *GSTP1*, as médias do número de cópias de DNA nestas três amostras apresentam-se da mesma forma. *GSTP1* apresentou a menor frequência de ganhos de número de cópias, tanto em LN- quanto em LN+, como demonstrado pelos resultados qualitativos.

Não existem muitos estudos em relação ao número de cópias dos genes *FOSL1* e *GSTP1*, mas diversos sobre sua expressão, especialmente sobre o gene *GSTP1*, estudado principalmente em relação aos seus polimorfismos. Aqui revisamos alguns deles. Em outro estudo na população brasileira, compreendendo casos de carcinoma ductal *in situ* (CDIS) puro, CDIS associado à carcinoma invasivo e mais de 700 casos de carcinoma ductal invasivo (CDI), com o objetivo de avaliar se a expressão de *FOSL1* se altera durante a progressão tumoral mamária, como neste trabalho, Logullo *et al.* (2011) analisaram a expressão de *FOSL1* por imunohistoquímica e mostraram que a frequência da expressão de *FOSL1* em lesões infiltrativas era significativamente menor (22,8%) do que em CDIS (42,2%). Não foram encontradas evidências de associação entre a expressão de *FOSL1* e fatores prognósticos em CDIS, o que significa que a alta frequência da expressão de *FOSL1* pode estar associada a eventos iniciais na carcinogênese.

FOSL1 mostrou-se superexpresso em diversos tipos de câncer agressivos (DEBINSKI e GIBO, 2005) e foi previamente encontrada alta concentração do seu RNAm em linhagens celulares de câncer de mama RE-negativas que mostravam invasividade local (BELGUISE *et al.*, 2005). O mesmo estudo mostrou que a superexpressão de *FOSL1* era suficiente para aumentar a proliferação e mobilidade

celular em células MCF-7, e, ao contrário, o silenciamento de *FOSL1* diminuía os mesmos dois parâmetros em células MDA-MB231. Os mesmos autores mostraram que a expressão de *FOSL1* estava associada com um fenótipo celular mais agressivo, sugerindo uma participação importante na progressão do câncer de mama.

Em um painel de 16 linhagens celulares de câncer de mama, incluindo cinco RE-positivas, cinco ERBB2-positivas e seis triplo-negativas (TN) basal-like, a proteína FOSL1 foi encontrada altamente expressa em todas as linhagens celulares TN (ZHAO *et al.*, 2014). Admitindo que FOSL1 tem uma função importante na metastatização tumoral, os autores também mostraram que FOSL1 e c-Jun promovem invasão celular tanto *in vitro* quanto *in vivo*. De acordo com este achado, FOSL1 se mostrou envolvido nas capacidades migratórias e invasivas de diversas linhagens celulares.

O genótipo *FOSL1*(-/-) em um modelo de camundongo *knockout* revelou-se letal devido à falta de vascularização adequada da placenta, indicando que o gene é essencial para o processo angiogênico (SCHREIBER *et al.*, 2000). Além disso, a introdução de FOSL1 ectópico provoca alterações fenotípicas importantes e altera as características malignas de células de glioma independentemente dos níveis basais desta proteína (DEBINSKI e GIBO, 2005).

Em um estudo comparando tecido mamário com câncer com o tecido normal adjacente (KHARMAN-BIZ *et al.*, 2013), *FOSL1* mostrou expressão significativamente maior em tumores comparada com os tecidos adjacentes ($p < 0,001$). Além disso, *FOSL1* estava superexpresso nos tumores mamários classificados como RE-negativos ($p = 0,012$) e RP-negativos ($p = 0,037$). A expressão de *FOSL1* foi significativamente maior em tumores triplo-negativos quando comparada com a observada nos carcinomas luminais ($p = 0,01$).

Em um estudo utilizando diversas técnicas para identificar a expressão de *FOSL1* em diferentes doenças da mama, Chiappetta *et al.* (2007) avaliaram, por imuno-histoquímica, *Western blot* e PCR em tempo real quantitativa e semiquantitativa, desde tecidos saudáveis até carcinomas agressivos, e observaram que a expressão de *FOSL1* começava a ser detectável em fibroadenomas e estágios hiperplásicos, e que era fortemente detectável em carcinomas. Ao contrário, tecidos mamários normais não mostraram expressão de *FOSL1* detectável. O nível de expressão gênica avaliado por qPCR foi mais de 40 vezes

maior nos carcinomas quando comparado com o de fibroadenomas e hiperplasias.

Ao estudar células de carcinoma de cólon, Vial e Marshall (2003) descreveram que altos níveis de atividade de ERK antagonizam a degradação dependente de proteassomo da proteína FOSL1, determinando níveis elevados de proteína sem alterar o nível de RNAm de *FOSL1*. Os autores também observaram que níveis elevados de *FOSL1* fornecem um sinal de sobrevivência para as células de carcinoma de cólon na ausência de adesão à matriz extracelular. Este mecanismo é um exemplo de regulação pós-traducional que poderia ocorrer também no tecido mamário analisado neste trabalho, onde observamos ganhos no número de cópias em *FOSL1*, embora sem diferença significativa de perdas e do número normal de cópias, mas não o aumento de expressão de seu RNAm.

Howie *et al.* (1989) utilizando radioimunoensaios, verificaram que os níveis de GST Pi eram significativamente maiores em tumores de mama RE-negativos ($P < 0,01$).

Vecanova *et al.* (2011) avaliaram, por ensaios de imuno-histoquímica, 43 amostras de carcinoma mamário (34 delas do tipo ductal) e 5 amostras de tecido normal. No grupo de carcinomas ductais, 61,8% eram GSTP1-positivas, enquanto todas as amostras de tecido normal mostraram forte expressão de GSTP1.

Estudando o perfil de metilação de tumores triplo-negativos (TN) e não-triplo-negativos (não-TN), Branhan *et al.* (2012) observaram que uma das características que diferenciam os TN é a não metilação da região promotora de *GSTP1*. Apesar deste estudo ter sido direcionado para TN vs. não-TN, podemos inferir o perfil de metilação como um dos mecanismos subjacente à regulação da expressão de diversos genes, podendo promover diferenças nos níveis de expressão, sem dependência do número de cópias de DNA.

Com uma abordagem diferente, Huang *et al.* (2003) mostraram que 58% dos tumores de mama analisados expressaram *GSTP1* e que a co-expressão de *GSTP1* e *BCL2* influenciou a localização de GSTP1 predominantemente nos núcleos das células tumorais. Os autores também observaram, pelas curvas de sobrevida livre de doença obtidas pelo método de Kaplan-Meier, uma diferença significativa entre casos de câncer de mama GSTP1-positivos e GSTP1-negativos ($P = 0,002$). A sobrevida livre de doença em pacientes com tumores GSTP1-positivos também foi pior do que a de pacientes com tumores GSTP1-negativos dentre aqueles que foram submetidos à quimioterapia neoadjuvante ($P = 0,04$). Em pacientes com

comprometimento de linfonodos, a imunopositividade para GSTP1 influenciou a sobrevida livre de doença. A recorrência dos tumores também foi significativamente influenciada pela imunorreatividade de GSTP1 (RR=8,1).

Neste trabalho, não encontramos diferenças estatisticamente significantes nas alterações do número de cópias entre os dois grupos analisados, LN- e LN+. Estes resultados sugerem, como mencionado anteriormente, que estas alterações são eventos iniciais na tumorigênese mamária, uma vez que elas estando presentes, sem diferença estatística, nos tumores primários tanto das pacientes sem como das com metástases axilares, não os diferenciam em termos de progressão e de prognóstico. As variações da expressão gênica não apresentam dependência das alterações do número de cópias, exceto para o gene *FADD* em LN+.

Na pesquisa de Tang e Amon (2013), diversos trabalhos sobre a análise do número de cópias e da expressão gênica e proteica em humanos e em outros organismos são citados, e pode-se observar a seguinte conclusão: “Assim, as alterações do número de cópias geralmente se traduzem em alterações da expressão gênica”, porém, nossos dados sugerem a existência de outros mecanismos envolvidos na regulação gênica (JONES *et al.*, 2008), possivelmente em nível transcricional (como epigenética, pela inibição da transcrição através de padrões de metilação, BRANHAN *et al.*, 2012) ou traducional (com RNA de interferência bloqueando a tradução do RNAm, por exemplo no caso descrito por Belguise *et al.* (2005), no qual a inibição de *FOSL1* por RNAi reduziu a invasão e a migração celular em linhagens celulares de câncer de mama).

Em um estudo com tumores de cólon, Platzer *et al.* (2002) descreveram que apenas 3,8% dos genes em regiões amplificadas estavam mais expressos (duas vezes mais expressos) quando comparados com o epitélio normal de cólon.

Em relação aos parâmetros histopatológicos analisados neste trabalho, podemos estabelecer a relação direta entre o tamanho do tumor e a presença de metástases. Uma vez que no grupo LN+ foram encontradas as maiores médias de tamanho tumoral. Este resultado era esperado uma vez que as pacientes com metástases ao diagnóstico já apresentavam uma progressão mais significativa do tumor do que as pacientes sem metástases.

Em relação ao grau do tumor, foi observado que o grau II é o mais frequente em todos os genes nas duas amostras, tendo sua distribuição concordante com a do número de cópias. Isto é, foram mais frequentes nas amostras com alterações do

número de cópias também mais frequentes. Esta mesma correspondência não foi descrita por Pollack *et al.* (2002), em uma análise por hibridização genômica comparativa em microarranjos do número de cópias de DNA de todo o genoma. Em uma série de tumores de mama, mostraram que o número total de alterações genômicas (ganhos e perdas) era significativamente maior em tumores de mama com alto grau histológico ($P=0,008$).

As diferenças significativas observadas entre LN- e LN+ nos graus I, II e III no total de ganhos e número de cópias normal e também para o total dos cinco genes foram principalmente devidas ao maior número de tumores grau I observados nas pacientes LN- e menor nas pacientes LN+ em relação ao número esperado, com o valor do χ^2 parcial dessas duas classes representando cerca de 80% do valor total do χ^2 em todas as comparações acima citadas. Esses resultados eram esperados, considerando a clínica das pacientes analisadas ao diagnóstico (sem e com comprometimento dos linfonodos axilares).

A mesma análise se aplica ao estágio do tumor, uma vez que, para este parâmetro, os tumores com estágio 2 foram mais frequentes e os resultados estatisticamente significativos foram principalmente devidos ao menor e maior número observado de tumores com estágios 3+4, respectivamente, nas pacientes LN- e LN+, em relação aos valores esperados, com valor do χ^2 parcial destas duas classes representando cerca de 70% do valor total do χ^2 .

Considerando os receptores hormonais, como o *status* de ERBB2, podemos observar que os tumores com e sem amplificação de ERBB2 foram igualmente distribuídos nos dois grupos de pacientes, e este parâmetro não se correlacionou com as alterações de número de cópias dos genes analisados. Também não se observou diferenças significativas entre as alterações do número de cópias em cada gene nas duas amostras.

Em relação ao receptor de estrogênio, os tumores RE-positivos foram mais frequentemente observados nos dois grupos e nas pacientes com alterações no número de cópias de quatro genes, *FOSL1*, *NTSR1*, *FADD* e *CCND1*. Apenas para o gene *GSTP1* RE+ foi mais frequentemente observado nas pacientes com número de cópias normal, resultado este contrário ao estudo apresentado por Howie *et al.* (1989), no qual os níveis de GST Pi eram significativamente maiores em tumores de mama RE-negativos. Belguise *et al.* (2005) observaram que existe uma alta

concentração de RNAm de *FOSL1* em linhagens celulares de tumores de mama RE-negativos, o que não foi observado neste trabalho.

Os resultados com diferenças estatisticamente significativas foram devidos principalmente ao menor e ao maior número de casos RE-negativos observados nas pacientes LN- e LN+, respectivamente, em relação aos valores esperados, com o valor parcial do χ^2 dessas duas classes representando cerca de 70% do valor total do χ^2 .

Em relação ao receptor de progesterona, os tumores RP-positivos foram mais frequentemente observados nas pacientes com alterações de número de cópias em quatro genes dos dois grupos: *FOSL1*, *NTSR1*, *FADD* e *CCND1*. Novamente, apenas para *GSTP1* a classe RP+ foi mais frequentemente observada nos pacientes com número de cópias normal. Os resultados estatisticamente significativos foram devidos principalmente ao menor e ao maior número de casos RP-negativos observados em LN- e LN+, respectivamente, em relação aos valores esperados, com o valor do χ^2 parcial dessas duas classes representando cerca de 70% do valor total do χ^2 .

Os resultados apresentados nas análises de evolução clínica das pacientes LN- e LN+ demonstram uma evolução clínica desfavorável para as pacientes LN+ quando comparadas com as pacientes LN-. Esses resultados eram esperados devido à complexidade clínica dos dois grupos ao diagnóstico, confirmando o que é universalmente aceito sobre a importância do diagnóstico precoce de uma doença que é responsável por uma mortalidade e uma morbidade consideráveis na população feminina no mundo todo.

8. CONCLUSÃO

Concluindo este trabalho, podemos destacar que:

Os genes *FOSL1*, *GSTP1*, *NTSR1*, *FADD* e *CCND1* possuem alterações de número de cópias nos dois grupos amostrais (LN- e LN+), principalmente ganhos em *NTSR1*, *FADD* e *CCND1*.

No entanto, em geral, não se identificou diferença estatisticamente significativa entre as alterações nestes genes entre as duas amostras, indicando que as mesmas devem estar envolvidas nos eventos iniciais da tumorigênese mamária e não na sua progressão.

A expressão dos genes *FOSL1*, *GSTP1*, *FADD* e *CCND1* não depende das alterações de número de cópias em LN- e LN+, e portanto outros mecanismos devem explicar as alterações de expressão observadas.

As alterações de número de cópias não são associadas a nenhum dos parâmetros clínicos e histopatológicos analisados, não sendo, portanto, indicativos que possam ser utilizados como fator prognóstico.

As diferenças significativas observadas nos parâmetros clínicos e histopatológicos entre as pacientes LN- e LN+ estão de acordo com a evolução clínica das pacientes de cada uma das amostras.

Referências

- Abdul-Rasool S, Kidson SH, Panieri E, Dent D, Pillay K, Hanekom GS. An evaluation of molecular markers for improved detection of breast cancer metastases in sentinel nodes. **Journal of Clinical Pathology**, 59: 289-297, 2006.
- ACS: American Cancer Society (2011). www.cancer.org. Acesso em agosto de 2015.
- Alizart M, Saunus J, Cummings M, Lakhani SR. Molecular classification of breast carcinoma. **Diagnostic Histopathology**, 18(3): 97–103, 2012.
- Balmain A, Gray J, Ponder B. The genetics and genomics of cancer. **Nature Genetics**, 33: 238 – 247, 2003.
- Barnes DM, Gillett CE. Cyclin D1 in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.**, 52(1-3):1-15, 1998.
- Bartek J, Lukas J. DNA repair: Cyclin D1 multitasks. **Nature**, 474(7350):171-2, 2011.
- Bateman, A.C. **Breast Pathology**. Basic Science. Surgery, 25(6): 245-250, 2007.
- Beiguelman B. **Curso Prático de Estatística**. Ribeirão Preto (SP). Sociedade Brasileira de Genética, 1988.
- Belguise K, Kersual N, Galtier F, Chalbos D. FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells. **Oncogene**, 24(8): 1434-44, 2005.
- Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, Barretina J, Boehm JS, Dobson J, Urashima M, Mc Henry KT, Pinchback RM, Ligon AH, Cho YJ, Haery L, Greulich H, Reich M, Winckler W, Lawrence MS, Weir BA, Tanaka KE, Chiang DY, Bass AJ, Loo A, Hoffman C, Prensner J, Liefeld T, Gao Q, Yecies D, Signoretti S, Maher E, Kaye FJ, Sasaki H, Tepper JE, Fletcher JA, Tabernero J, Baselga J, Tsao MS, Demichelis F, Rubin MA, Janne PA, Daly MJ, Nucera C, Levine RL, Ebert BL, Gabriel S, Rustgi AK, Antonescu CR, Ladanyi M, Letai A, Garraway LA, Loda M, Beer DG, True LD, Okamoto A, Pomeroy SL, Singer S, Golub TR, Lander ES, Getz G, Sellers WR, Meyerson M. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. **Nature**, 463(7283):899-905, 2010.
- Bièche I, Champègne ML, Matifas F, Cropp CS, Callahan R, Lidereau R. Two distinct regions involved in 1p deletion in human primary breast cancer. **Cancer Research**, 53: 1950-1994, 1993.
- Birnbaum D, Bertucci F, Ginestier C, Tagett R, Jacquemier J, Charafe-Jauffret E. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? (review). **International Journal of Oncology**, Athens, 25: 249-258, 2004.
- Bostner J, Ahnström Waltersson M, Fornander T, Skoog L, Nordenskjöld B, Stål O. Amplification of CCND1 and PAK1 as predictors of recurrence and tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer. **Oncogene**, 26(49):6997-7005, 2007.

- Branham MT, Marzese DM, Laurito SR, Gago FE, Orozco JI, Tello OM, Vargas-Roig LM, Roqué M. Methylation profile of triple-negative breast carcinomas. **Oncogenesis**, 1:e17, 2012.
- Burandt E, Grünert M, Lebeau A, Choschzick M, Quaas A, Jänicke F, Müller V, Scholz U, Bokemeyer C, Petersen C, Geist S, Paluchowski P, Wilke C, Heilenkötter U, Simon R, Sauter G, Wilczak W. Cyclin D1 gene amplification is highly homogeneous in breast cancer. **Breast Cancer**. 2014 May 27. [Epub ahead of print]
- Burstein HJ, Prestrud AA, Seidenfeld J, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KE, Giordano SH, Hudis CA, Malin J, Mamounas EP, Rowden D, Solky AJ, Sowers MR, Stearns V, Winer EP, Somerfield MR, Griggs JJ; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. **J Clin Oncol.**, 28(23):3784-96, 2010.
- Carraway R, Leeman SE. The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. **J Biol Chem**, 248(19):6854-61, 1973.
- Carraway RE, Plona AM. Involvement of neurotensin in cancer growth: evidence, mechanisms and development of diagnostic tools. **Peptides**, 27(10):2445-60, 2006.
- Cebrian A, Pharoah PD, Ahmed S, Roperio S, Fraga MF, Smith PL, Conroy D, Luben R, Perkins B, Easton DF, Dunning AM, Esteller MI, Ponder BAJ. Genetic variants in epigenetic genes and breast cancer risk. **Carcinogenesis**, 27(8): 1661-9, 2006.
- Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. **Immunity**, 7(6):821-30, 1997.
- Chiappetta G, Ferraro A, Botti G, Monaco M, Pasquinelli R, Vuttariello E, Arnaldi L, Di Bonito M, D'Aiuto G, Pierantoni GM, Fusco A. FRA-1 protein overexpression is a feature of hyperplastic and neoplastic breast disorders. **BMC Cancer**, 7:17, 2007.
- Chirilă DN, Bălăcescu O, Popp R, Oprea A, Constantea NA, Vesa S, Ciuce C. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in patients with multiple breast cancers and breast cancer in association with another type of cancer. **Chirurgia (Bucur)**, 109(5):626-33, 2014.
- Choi EJ, Yun JA, Jabeen S, Jeon EK, Won HS, Ko YH, Kim SY. Prognostic significance of TMEM16A, PPFIA1, and FADD expression in invasive ductal carcinoma of the breast. **World J Surg Oncol**, 12:137, 2014.
- Collins JA, Blake JM, Crosignani PG. Breast cancer risk with postmenopausal treatment. **Human Reproduction**, Update 11(6): 545-560, 2005.
- Courtillot C, Plu-Bureau G, Binart N, Nalleyguier C, Sigalzafrani B, Goffin V, Kuttenn F, Kelly PA, Ouraine P. Benign Breast Diseases. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, 10: 325-335, 2005.
- Crespi B, Summers K. Evolutionary biology of cancer. **Trends in Ecology and Evolution**, 20(10): 545-52, 2005.
- Debinski W, Gibo DM. Fos-related antigen 1 modulates malignant features of glioma cells. **Mol Cancer Res**, 237-49, 2005.

- Diehl JA. Cycling to cancer with cyclin D1. **Cancer Biol Ther.**, 1(3):226-31, 2002.
- Dufloth RM, Carvalho S, Heinrich JK, Shinzato JY, Santos CC, Zeferino LC, Schmitt F. Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. **São Paulo Medical Journal**, 123(4): 192-7, 2005.
- Dunning AM, Healey CS, Pharoah PDP, Teare MD, Ponder BAJ, Easton DF. A Systematic Review of Genetic Polymorphisms and Breast Cancer Risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, 8: 843-854, 1999.
- Dupouy S, Doan VK, Wu Z, Mourra N, Liu J, De Wever O, Llorca FP, Cayre A, Kouchkar A, Gompel A, Forgez P. Activation of EGFR, HER2 and HER3 by neurotensin/neurotensin receptor 1 renders breast tumors aggressive yet highly responsive to lapatinib and metformin in mice. **Oncotarget**, 5(18):8235-51, 2014.
- Dupouy S, Mourra N, Doan VK, Gompel A, Alifano M, Forgez P. The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. **Biochimie**, 93(9):1369-78, 2011.
- Dupouy S, Viardot-Foucault V, Alifano M, Souazé F, Plu-Bureau G, Chaouat M, Lavour A, Hugol D, Gespach C, Gompel A, Forgez P. The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression. **PLoS One**, 4(1): e4223, 2009.
- Eheman CR, Shaw KM, Ryerson AB, Miller JW, Ajani UA, White MC. The Changing Incidence of In situ and Invasive Ductal and Lobular Breast Carcinomas: United States, 1999-2004. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 18(6): 1763-1769, 2009.
- Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, 19(5):403-10, 1991.
- Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treat Rev**. 38(6):698-707, 2012.
- Estourgie SH, Tanis PJ, Nieweg OE, Valdés Olmos RA, Rutgers EJ, Kroon BB. Should the hunt for internal mammary chain sentinel nodes begin? An evaluation of 150 breast cancer patients. **Annals of Surgery Oncology**, 10: 935-941, 2004.
- Evers BM. Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues. **Peptides**, 27(10):2424-33, 2006.
- Fan S, Müller S, Chen ZG, Pan L, Tighiouart M, Shin DM, Khuri FR, Sun SY. Prognostic impact of Fas-associated death domain, a key component in death receptor signaling, is dependent on the presence of lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Biol Ther**, 14(4): 365-9, 2013.
- Fares F, Azzam N, Fares B, Larsen S, Lindkaer-Jensen S. Benzene-poly-carboxylic acid complex, a novel anti-cancer agent induces apoptosis in human breast cancer cells. **PLoS One**, 9(2):e85156, 2014.
- Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larsimont D, Macgrogan G, Bergh J, Cameron D, Goldstein D, Duss S, Nicoulaz AI, Brisken C, Fiche M, Delorenzi M, Iggpo R. (2005). Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray. **Oncogene**, 24: 4660-4671, 2005.

- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, 61: 759-767, 1990.
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. **Nat Rev Genet.**, 7(2):85-97, 2006.
- Franco RL, Schenka NG, Schenka AA, Rezende LF, Gurgel MS. Glutathione S-transferase Pi expression in invasive breast cancer and its relation with the clinical outcome. **J Buon.** 17(2): 259-64, 2012.
- Gerger A, Langsenlehner U, Renner W, Weitzer W, Eder T, Yazdani-Biuki B, Hofmann G, Samonigg H, Krippel P. A multigenic approach to predict breast cancer risk. **Breast Cancer Research and Treatment**, 104(2): 159-64, 2007.
- Gillett C, Fantl V, Smith R, Fisher C, Bartek J, Dickson C, Barnes D, Peters G. Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. **Cancer Res.**, 54(7):1812-7, 1994.
- Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ. 10th St. Gallen conference. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. **Ann Oncol.**, 18(7): 1133-44, 2007.
- Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Ann Oncol.**, 22(8):1736-47, 2011.
- Guimarães, J.R. **Manual de oncologia**. 3ª ed. São Paulo: Libbs Farmacêutica, 2008.
- Gully D, Canton M, Boigegrain R, Jeanjean F, Molimard JC, Poncelet M, Gueudet C, Heaulme M, Leyris R, Brouard A, et al. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90(1):65-9, 1993.
- Gully D, Labeeuw B, Boigegrain R, Oury-Donat F, Bachy A, Poncelet M, Steinberg R, Suaud-Chagny MF, Santucci V, Vita N, Pecceu F, Labbé-Jullié C, Kitabgi P, Soubrié P, Le Fur G, Maffrand JP. Biochemical and pharmacological activities of SR 142948A, a new potent neurotensin receptor antagonist. **J Pharmacol Exp Ther.**, 280(2):802-12, 1997.
- Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. **J Clin Oncol.**, 25(33):5287-312, 2007.
- Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **Biomed Res Int.**, 2014:150845, 2014.
- Holm K, Staaf J, Jönsson G, Vallon-Christersson J, Gunnarsson H, Arason A, Magnusson L, Barkardottir RB, Hegardt C, Ringnér M, Borg A. Characterisation of amplification patterns and target genes at chromosome 11q13 in CCND1-amplified sporadic and familial breast tumours. **Breast Cancer Res Treat.**, 133(2):583-94, 2012.

- Howie AF, Miller WR, Hawkins RA, Hutchinson AR, Beckett GJ. Expression of glutathione S-transferase B1, B2, Mu and Pi in breast cancers and their relationship to oestrogen receptor status. **Br J Cancer**. 60(6):834-7, 1989.
- Hu N, Li Y, Zhao Y, Wang Q, You J, Zhang X, Ye L. A novel positive feedback loop involving FASN/p-ERK1/2/5-LOX/LTB4/FASN sustains high growth of breast cancer cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, 32: 921–929, 2001.
- Huang J, Tan PH, Thiyagarajan J, Bay BH. Prognostic significance of glutathione S-transferase-pi in invasive breast cancer. **Mod Pathol**, 16(6):558-65, 2003.
- INCA - Instituto Nacional do Câncer (2014). **Estimativa 2014: incidência de Câncer no Brasil**. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>. Acesso em julho de 2015.
- INCA - Instituto Nacional do Câncer. **TNM Classificação de tumores malignos**. Traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 254p. 6. ed. - Rio de Janeiro, 2004.
- Järvinen AK, Autio R, Haapa-Paananen S, Wolf M, Saarela M, Grénman R, Leivo I, Kallioniemi O, Mäkitie AA, Monni O. Identification of target genes in laryngeal squamous cell carcinoma by high-resolution copy number and gene expression microarray analyses. **Oncogene**, 25(52):6997-7008, 2006.
- Järvinen AK, Autio R, Kilpinen S, Saarela M, Leivo I, Grénman R, Mäkitie AA, Monni O. High-resolution copy number and gene expression microarray analyses of head and neck squamous cell carcinoma cell lines of tongue and larynx. **Genes Chromosomes Cancer**, 47(6):500-9, 2008.
- Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, Hong SM, Fu B, Lin MT, Calhoun ES, Kamiyama M, Walter K, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, Hidalgo M, Leach SD, Klein AP, Jaffee EM, Goggins M, Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Eshleman JR, Kern SE, Hruban RH, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. **Science**, 321(5897):1801-6, 2008.
- Kallioniemi A. CGH microarrays and cancer. **Curr Opin Biotechnol**. 19(1):36-40, 2008.
- Kharman-Biz A, Gao H, Ghiasvand R, Zhao C, Zendejdel K, Dahlman-Wright K. Expression of activator protein-1 (AP-1) family members in breast cancer. **BMC Cancer**, 13:441, 2013.
- Khabaz MN. Polymorphism of the glutathione S-transferase P1 gene (GST-pi) in breast carcinoma. **Pol J Pathol.**, 65(2):141-6, 2014.
- Kim MJ, Ro JY, Ahn SH, Kim HH, Kim SB, Gong G. Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. **Hum Pathol**. 37(9):1217-26, 2006a.
- Kim MY, Yim SH, Kwon MS, Kim TM, Shin SH, Kang HM, Lee C, Chung YJ. Recurrent genomic alterations with impact on survival in colorectal cancer identified by genome-wide array comparative genomic hybridization. **Gastroenterology**, 131(6):1913-24, 2006b.
- Kitabgi P. Functional domains of the subtype 1 neurotensin receptor (NTS1). **Peptides**, 27(10):2461-8, 2006.

- Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 68: 820-823, 1971.
- Kuang AA, Diehl GE, Zhang J, Winoto A. FADD is required for DR4- and DR5-mediated apoptosis: lack of trail-induced apoptosis in FADD-deficient mouse embryonic fibroblasts. **J Biol Chem**, 275(33):25065-8, 2000.
- Kuschel B, Auranen A, McBride S, Novik KL, Antoniou A, Lipscombe JM, Day NE, Easton DF, Ponder BAJ, Pharoah PDP, Dunning A. Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. **Human Molecular Genetics**, 11(12): 1399-407, 2002.
- Kustikova O, Kramerov D, Grigorian M, Berezin V, Bock E, Lukanidin E, Tulchinsky E. Fra-1 induces morphological transformation and increases in vitro invasiveness and motility of epithelioid adenocarcinoma cells. **Mol Cell Biol**, 18(12):7095-105, 1998.
- Landercasper J, Dietrich LL, Johnson JM. A breast center review of compliance with National Comprehensive Cancer Network Breast Cancer guidelines. **Am J Surg**, 192(4): 525-7, 2006.
- Langsenlehner U, Krippel P, Renner W, Yazdani-Biuki B, Wolf G, Wascher TC, Paulweber B, Weitzer W, Samonigg H. The common 677C>T gene polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with breast cancer risk. **Breast Cancer Research and Treatment**, 81(2): 169-72, 2003.
- Lee KF, Weng JT, Hsu PW, Chi YH, Chen CK, Liu IY, Chen YC, Wu LS. Gene expression profiling of biological pathway alterations by radiation exposure. **Biomed Res Int**, 2014:834087, 2014.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-CT Method. **Methods**, 25:402-408, 2001.
- Logullo AF, Stiepcich MM, Osório CA, Nonogaki S, Pasini FS, Rocha RM, Soares FA, Brentani MM. Role of Fos-related antigen 1 in the progression and prognosis of ductal breast carcinoma. **Histopathology**, 58(4):617-25, 2011.
- Loi S. Molecular analysis of hormone receptor positive (luminal) breast cancers – What have we learnt? **European Journal of Cancer**, 44:2813 –18, 2008.
- Louro ID, Lierena Jr JC, Melo MSV, Ashton-Prola P, Froes NC. **Genética molecular do câncer**. 2 ed., São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.
- Lundin J. The Nottingham Prognostic Index - from relative to absolute risk prediction. **European Journal of Cancer**, 43: 1498-1500, 2007.
- Luo YP, Zhou H, Krueger J, Kaplan C, Liao D, Markowitz D, Liu C, Chen T, Chuang TH, Xiang R, Reisfeld RA. The role of proto-oncogene Fra-1 in remodeling the tumor microenvironment in support of breast tumor cell invasion and progression. **Oncogene**, 29(5):662-73, 2010.
- Marchio C, Natrajan R, Shiu KK, Rodriguez-Pinila SM, Tan DS, Lord CJ, Hungermann D, Fenwick K, Tamber, N Mackay A, Palacios J, Sapino A, Buerger H, Ashworth A, Reis-Filho JS. The genomic profile of Her2-amplified breast cancers: The influence of ER status. **J. Pathol**, 216: 399-407, 2008.

- Matsuyoshi S, Shimada K, Nakamura M, Ishida E, Konishi N. FADD phosphorylation is critical for cell cycle regulation in breast cancer cells. **Br J Cancer**, 94(4):532-9, 2006.
- Menko FH, Ligtenberg MJ, Brouwer T, Hahn DE, Ausems MG. DNA-based diagnosis of hereditary tumour predisposition. **Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde**, 151(5): 295-8, 2007.
- Milde-Langosch K. The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. **Eur J Cancer**. 41(16): 2449-61, 2005.
- Nass SJ, Herman JG, Gabrielson E, Iversen PW, Parl FF, Davidson NE, Graff J. Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. **Cancer Research**, 60(16): 4346-8, 2000.
- Olszewski W, Chmielik E, Rys J. Pathomorphological selection of patients to systemic therapy. **Pol J Pathol**, 4: 28–33, 2011.
- Orr RK. Impact of prophylactic axillary node dissection on breast cancer survival-a Bayesian meta-analysis. **Annals of Surgery Oncology**, 6: 109-116, 1999.
- Pattje WJ, Melchers LJ, Slagter-Menkema L, Mastik MF, Schrijvers ML, Gibcus JH, Kluin PM, Hoegen-Chouvalova O, van der Laan BFAM, Roodenburg JLN, van der Wal JE, Schuurin E, Langendijk JA. FADD expression is associated with regional and distant metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Histopathology**, 63(2):263-70, 2013.
- Pennanen PT, Sarvilinna NS, Toimela T, Ylikomi TJ. Inhibition of FOSL1 overexpression in antiestrogen-resistant MCF-7 cells decreases cell growth and increases vacuolization and cell death. **Steroids**, 76(10-11):1063-8, 2011.
- Pennanen PT, Sarvilinna NS, Ylikomi TJ. Gene expression changes during the development of estrogen-independent and antiestrogen-resistant growth in breast cancer cell culture models. **Anticancer Drugs**, 20(1):51-8, 2009.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack Jr, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, London, 406: 747-752, 2000.
- Perquin M, Oster T, Maul A, Froment N, Untereiner M, Bagrel D. The glutathione-related detoxification pathway in the human breast: a highly coordinated system disrupted in the tumour tissues. **Cancer Lett.**, 158(1):7-16, 2000.
- Pharoah PDP, Tyrer J, Dunning AM, Easton DF, Ponder BAJ, SEARCH Investigators. Association between common variation in 120 candidate genes and breast cancer risk. **PLoS genetics**, 3(3): e42, 2007.
- Platzer P, Upender MB, Wilson K, Willis J, Lutterbaugh J, Nosrati A, Willson JK, Mack D, Ried T, Markowitz S. Silence of chromosomal amplifications in colon cancer. **Cancer Res.**, 62(4):1134-8, 2002.
- Pimentel Gomes, F. **Curso de Estatística Experimental**. Ed. Livraria Nobel S.A, 6a Edição. Piracicaba, São Paulo, 1976.

- Pollack JR, Sørlie T, Perou CM, Rees CA, Jeffrey SS, Lonning PE, Tibshirani R, Botstein D, Børresen-Dale AL, Brown PO. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 99(20):12963-8, 2002.
- Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. **J Clin Oncol**, 26 (15): 2568-81, 2008.
- Rakha EA, Ellis IO. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. **Pathology**, 41(1): 40-7, 2009.
- Ravikumar G, Ananthamurthy A. Cyclin D1 expression in ductal carcinoma of the breast and its correlation with other prognostic parameters. **J Cancer Res Ther.**, 10(3):671-5, 2014.
- Recht A, Come SE, Gelman RS, Goldstein M, Tishler S, Gore SM, Abner AL, Vicini FA, Silver B, Connolly JL, et al. Integration of conservative surgery, radiotherapy, and chemotherapy for the treatment of early-stage, node-positive breast cancer: sequencing, timing, and outcome. **J Clin Oncol.**, 9(9):1662-7, 1991.
- Reintgen D, Giuliano R, Cox CE. Sentinel node biopsy in breast cancer: an overview. **The Breast Journal**, 6: 299-305, 2000.
- Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. **Lancet**, 378:1812-23, 2011.
- Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. **J. Clin. Pathol.**, 59: 225-231, 2006.
- Reubi JC, Waser B, Friess H, Büchler M, Laissue J. Neurotensin receptors: a new marker for human ductal pancreatic adenocarcinoma. **Gut**, 42(4):546-50, 1998.
- Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **Canadian Medical Association Journal**, 174(3): 10.1503, 2006.
- Roy PG, Thompson AM. Cyclin D1 and breast cancer. **Breast**, 15(6):718-27, 2006.
- Sakorafas GH, Tsiotou AG, Balsiger BM. Axillary lymph node dissection in breast cancer: current status and controversies, alternative strategies and future perspectives. **Acta Oncology**, 39: 455-466, 2000.
- Sandhu R, Parker JS, Jones WD, Livasy CA, Coleman WB. Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy. **Lab Medicine.**, 41(6):364-72, 2010.
- Schreiber M, Wang ZQ, Jochum W, Fetka I, Elliott C, Wagner EF. Placental vascularisation requires the AP-1 component FRA1. **Development**, 127(22):4937-48, 2000.
- Seshadri R, Lee CS, Hui R, McCaul K, Horsfall DJ, Sutherland RL. Cyclin D1 amplification is not associated with reduced overall survival in primary breast cancer but may predict early relapse in patients with features of good prognosis. **Clin Cancer Res.**, 2(7):1177-84, 1996.
- Sheikh MS, Huang Y. The FADD is going nuclear. **Cell Cycle**, 2(4):346-7, 2003.

- Sicinski P, Donaher JL, Parker SB, Li T, Fazeli A, Gardner H, Haslam SZ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. **Cell**, 82(4):621-30, 1995.
- Smith TR, Miller MS, Lohman KK, Case LD, Hu JJ. DNA damage and breast cancer risk. **Carcinogenesis**, 24(5): 883-889, 2003.
- Somaï S, Gompel A, Rostène W, Forgez P. Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, 295(2):482-8, 2002.
- Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, Borresen-Dale AL. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. **BMC Genomics**, London, 7: 127, 2006.
- Souazé F, Dupouy S, Viardot-Foucault V, Bruyneel E, Attoub S, Gespach C, Gompel A, Forgez P. Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. **Cancer Res**, 66(12): 6243-9, 2006.
- Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. **Nat Rev Cancer**, 7(10): 791-799, 2007.
- Stinson S, Lackner MR, Adai AT, Yu N, Kim HJ, O'Brien C, Spoerke J, Jhunjunwala S, Boyd Z, Januario T, Newman RJ, Yue P, Bourgon R, Modrusan Z, Stern HM, Warming S, de Sauvage FJ, Amler L, Yeh RF, Dornan D. TRPS1 targeting by miR-221/222 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. **Sci Signal**, 4(177):ra41, 2011.
- Sugahara K, Michikawa Y, Ishikawa K, Shoji Y, Iwakawa M, Shibahara T, Imai T. Combination effects of distinct cores in 11q13 amplification region on cervical lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. **Int J Oncol.**, 39(4):761-9, 2011.
- Sugimura T. Cancer prevention: past, present, future. **Mutation Research**, 402: 7-14, 1998.
- Tang YC, Amon A. Gene copy-number alterations: a cost-benefit analysis. **Cell**, 152(3):394-405, 2013.
- Tew KD, Manevich Y, Grek C, Xiong Y, Uys J, Townsend DM. The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer. **Free Radic Biol Med.**, 51(2):299-313, 2011.
- Thomas LR, Stillman DJ, Thorburn A. Regulation of Fas-associated death domain interactions by the death effector domain identified by a modified reverse two-hybrid screen. **J Biol Chem.**, 277(37):34343-8, 2002.
- Torresan C. **Identificação de marcadores moleculares em metástases de linfonodos sentinela mamários**. 168f. Tese (Doutorado em Genética) – Programa de Pós-graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.
- UICC – Union for International Cancer Control. **TNM Classification for malignant tumours**. Editors: Sobin LH, Wittekind C. 6th edition, 2002.
- Unlü A, Ates NA, Tamer L, Ates C. Relation of glutathione S-transferase T1, M1 and P1 genotypes and breast cancer risk. **Cell Biochem Funct.**, 26(5):643-7, 2008.

- Vaz M, Reddy SP. FOSL1. In Yusuf D et al.: The Transcription Factor Encyclopedia, **Genome Biology**, 13:R24, 2012.
- Vargo-Gogola T, Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews**, London, v. 7(9): 659-72, 2007.
- Vecanova J, Hodorova I, Mihalik J, Benicky M, Kluchova D, Rybarova S. Immunohistochemical evaluation of Pi class glutathione S-transferase expression in invasive breast carcinoma. **Bratisl Lek Listy**, 112(2):67-70, 2011.
- Veronesi U, Galimberti V, Zurrada S, Pigatto F, Veronesi P, Robertson C, Paganelli G, Sciascia V, Viale G. Sentinel lymph node biopsy as an indicator for axillary dissection in early breast cancer. **European Journal of Cancer**, 37: 454-458, 2001.
- Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrada S, Galimberti V, Intra M, Veronesi P, Robertson C, Vaisonneuve P, Renne G, De Cicco C, De Lucia F, Gennari R. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, 349: 546-553, 2003.
- Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, Viale G, Zurrada S, Bedoni M, Costa A, de Cicco C, Geraghty JG, Luini A, Sacchini V, Veronesi P. Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes. **Lancet.**, 28;349(9069):1864-7, 1997.
- Vial E, Marshall CJ. Elevated ERK-MAP kinase activity protects the FOS family member FRA-1 against proteasomal degradation in colon carcinoma cells. **J Cell Sci.**, 116(Pt 24):4957-63, 2003.
- Viale G, Zurrada S, Maiorano E, Mazzarol G, Pruneri G, Paganelli G, Maionneuve P, Veronesi U. Predicting the status of axillary sentinel lymph nodes in 4351 patients with invasive breast carcinoma treated in a single institution, **Cancer**, 103: 492–500, 2005.
- Vilmont V, Filhol O, Hesse AM, Couté Y, Hue C, Rémy-Tourneur L, Mistou S, Cochet C, Chiocchia G. Modulatory role of the anti-apoptotic protein kinase CK2 in the sub-cellular localization of Fas associated death domain protein (FADD). **Biochim Biophys Acta**, pii: S0167-4889(15)00263-3, 2015. [Epub ahead of print]
- Weinberg RA. Tumor suppressor genes. **Science**, 254: 1138-1146, 1991.
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature**, 378(6559): 789-92, 1995.
- Wright FC, Walker J, Law CH, Mccready DR. Outcomes after localized axillary node recurrence in breast cancer. **Annals of Surgical Oncology**, 10: 1054-1058, 2003.
- Wu Z, Martinez-Fong D, Trédaniel J, Forgez P. Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 3:184, 2013.
- Yang S, Li Y, Gao J, Zhang T, Li S, Luo A, Chen H, Ding F, Wang X, Liu Z. MicroRNA-34 suppresses breast cancer invasion and metastasis by directly targeting Fra-1. **Oncogene**, 32(36):4294-303, 2013.

- Younes M, Wu Z, Dupouy S, Lupo AM, Mourra N, Takahashi T, Fléjou JF, Trédaniel J, Régnard JF, Damotte D, Alifano M, Forgez P. Neurotensin (NTS) and its receptor (NTSR1) causes EGFR, HER2 and HER3 over-expression and their autocrine/paracrine activation in lung tumors, confirming responsiveness to erlotinib. **Oncotarget**, 5(18):8252-69, 2014.
- Young MR, Colburn NH. Fra-1 a target for cancer prevention or intervention. **Gene**. 1;379: 1-11, 2006.
- Zajchowski DA, Bartholdi MF, Gong Y, Webster L, Liu HL, Munishkin A, Beauheim C, Harvey S, Ethier SP, Johnson PH Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. **Cancer Res**, 61(13):5168-78, 2001.
- Zhao L, Sun LH, Liu DM, He XY, Tao B, Ning G, Liu JM, Zhao HY. Copy number variation in CCND1 gene is implicated in the pathogenesis of sporadic parathyroid carcinoma. **World J Surg.**, 38(7):1730-7, 2014.
- Zheng W, Deitz AC, Campbell DR, Wen WQ, Cerhan JR, Sellers TA, Folsom AR, Hein DW. N -Acetyltransferase 1 Genetic Polymorphism , Cigarette Smoking , Well-Done Meat Intake , and Breast Cancer Risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, 8: 233-239, 1999.
- Zwijsen RM, Wientjens E, Klompmaker R, van der Sman J, Bernards R, Michalides RJ. CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. **Cell**, 88(3):405-15, 1997.

Apêndices

Apêndice 1: Informações clínico-histopatológicas das pacientes LN-.

Apêndice 2: Informações clínico-histopatológicas das pacientes LN+.

Apêndice 3: Informações de número de cópias de DNA das pacientes LN-.

Apêndice 4: Informações de número de cópias de DNA das pacientes LN+.

Apêndice 5: Caracterização das amostras LN- e LN+.

Apêndice 6: Artigo submetido à revista Cancer Genetics.

Apêndice 1: Informações clínico-histopatológicas das pacientes LN-.

Amostra	Idade	tam. tumor (cm)	grau	estágio	RE	RP	ERBB2	DD	OC	DOC	M
1	95,2	4,0	III	4	SI	SI	SI	11/1998	UC - SED	08/2003	57
2	50,0	5,0	II	1	POS	POS	SI	03/1999	SED	03/2015	192
3	71,2	3,5	II	2	SI	SI	SI	08/2000	UC - SED	12/2006	76
4	48,0	3,8	II	3	NEG	SI	SI	03/2001	O – m.c	03/2008	84
5	58,5	0,5	I	1	SI	SI	SI	06/2001	SED	03/2015	165
6	55,3	3,2	II	1	POS	SI	SI	08/2001	SED	03/2015	163
7	70,4	2,3	II	2	POS	POS	POS	10/2001	SED	03/2015	161
8	47,5	4,0	I	2	SI	SI	NEG	12/2001	UC - SED	01/2004	25
9	45,4	6,5	II	3	SI	SI	SI	SI			
10	70,2	4,0	I	2	POS	POS	NEG	03/2003	SED	03/2015	144
11	51,0	1,6	II	1	NEG	NEG	NEG	04/2003	UC – m.h	06/2008	62
12	40,0	3,2	III	2	SI	NEG	SI	05/2003	SED	03/2015	142
13	74,0	1,5	I	1	POS	POS	POS	SI			
14	66,8	4,0	I	1	POS	POS	POS	07/2003	SED	03/2015	140
15	41,0	3,0	II	3	SI	SI	POS	SI			
16	67,4	1,5	II	1	SI	POS	NEG	11/2003	SED	03/2015	136
17	50,3	1,5	III	1	POS	POS	POS	05/2005	SED	03/2015	118
18	42,5	1,5	I	1	SI	POS	NEG	10/2004	SED	03/2015	125
19	43,1	2,5	II	2	NEG	NEG	NEG	11/2004	UC - SED	03/2010	64
20	30,0	2,5	II	SI	SI	SI	SI	08/2005	UC - SED	08/2012	84
21	63,9	3,0	II	2	POS	POS	NEG	12/2005	SED	03/2015	111
22	51,8	2,0	III	2	POS	POS	POS	01/2006	SED	03/2015	110
23	75,6	1,2	II	1	SI	POS	NEG	03/2006	SED	03/2015	108
24	76,4	2,7	III	2	POS	POS	NEG	03/2006	UC - SED	07/2007	16
25	55,3	3,5	I	2	POS	POS	POS	05/2006	SED	03/2015	106
26	46,2	1,5	III	1	POS	POS	POS	06/2007	SED	03/2015	93
27	51,0	2,0	III	4	POS	POS	POS	06/2007	O	WI	
28	59,2	2,0	II	2	POS	POS	POS	07/2007	SED	03/2015	92
29	44,8	2,5	II	SI	POS	POS	POS	SI			

30	62,4	5,0	II	2	NEG	NEG	POS	12/2007	UC - m.ct	03/2015	87
31	33,0	4,0	III	2	POS	POS	NEG	02/2009	SED	03/2015	73
32	62,0	SI	II	1	POS	POS	NEG	07/2009	SED	03/2015	68
33	57,0	2,0	II	2	POS	POS	POS	10/2009	SED	03/2015	65
34	45,0	0,5	I	1	POS	POS	POS	02/2010	SED	03/2015	61
35	49,4	4,0	II	2	POS	POS	SI	06/2010	SED	03/2015	57
36	71,0	1,8	III	1	POS	POS	NEG	07/2010	SED	03/2015	56
37	74,0	3,5	III	2	NEG	NEG	SI	10/2010	SED	03/2015	53
38	80,8	2,8	II	SI	POS	POS	NEG	SI			
39	45,0	2,5	SI	2	NEG	NEG	NEG	03/2011	SED	03/2015	48
40	70,5	2,1	II	2	POS	POS	NEG	07/2012	SED	03/2015	32
41	78,9	2,5	III	2	POS	POS	NEG	08/2012	SED	03/2015	31
42	37,1	1,4	II	1	POS	POS	NEG	08/2012	SED	03/2015	31
43	65,1	2,2	I	2	POS	POS	NEG	09/2012	SED	03/2015	30
44	50,7	3,0	II	2	POS	POS	NEG	01/2013	SED	03/2015	26
45	58,1	2,5	II	2	POS	NEG	NEG	04/2013	SED	03/2015	25
46	57,0	1,5	I	1	POS	POS	NEG	08/2013	SED	03/2015	19
47	48,2	1,5	SI	1	POS	POS	NEG	09/2013	SED	03/2015	18
48	58,0	2,0	III	2	NEG	NEG	NEG	10/2013	SED	03/2015	17
49	58,7	1,5	II	1	POS	POS	NEG	11/2013	SED	03/2015	16
50	70,6	3,0	II	4	POS	POS	NEG	11/2013	SED	03/2015	16
51	66,5	1,0	I	1	POS	NEG	SI	11/2013	SED	03/2015	16
52	44,5	1,3	II	1	POS	POS	NEG	01/2014	SED	03/2015	14
53	35,6	2,4	III	2	NEG	NEG	NEG	03/2014	VCD - m.c	03/2015	12

LN-: pacientes sem metástases nos linfonodos axilares, POS: positivo, NEG: negativo, SI: sem informação, DD: data do diagnóstico, OC: ocorrência; DOC: data da ocorrência, M: meses; O: óbito, UC: última consulta, SED: sem evidência de doença, VCD: viva com doença, m.c: metástase sistema nervoso central, c.t: metástase cutânea, m.h: metástase hepática.

Apêndice 2: Informações clínico-histopatológicas das pacientes LN+.

Amostra	idade	Tam. tumor (cm)	grau	estágio	RE	RP	HER2	DD	OC	DOC	M
1	65,3	4,0	III	1	POS	POS	NEG	10/1998	O	09/2012	167
2	74,2	3,0	II	2	SI	SI	SI	SI			
3	41,2	4,5	II	2	SI	SI	SI	01/1999	O	10/1999	10
4	49,3	3,5	III	4	SI	SI	SI	SI			
5	57,2	1,5	II	1	NEG	NEG	POS	03/1999	SED	03/2015	192
6	30,3	10,0	II	3	SI	SI	SI	SI			
7	64,2	7,5	III	3	NEG	NEG	SI	05/2000	O	04/2001	11
8	53,2	SI	II	2	NEG	SI	SI	01/2001	O	SI	
9	63,0	SI	SI	SI	SI	SI	SI	02/2001	O	SI	
10	48,5	4,5	III	4	SI	SI	SI	03/2001	O	03/2003	24
11	47,7	6,5	III	SI	NEG	NEG	POS	03/2001	O - c.p	03/2011	120
12	90,7	6,5	II	4	POS	SI	SI	04/2001	VCD	03/2015	167
13	55,6	1,9	I	SI	POS	SI	SI	05/2001	O - m.d	04/2007	71
14	45,5	3,8	II	2	SI	SI	POS	06/2001	SED	03/2015	165
15	41,2	3,8	II	SI	SI	SI	SI	SI			
16	46,5	4,8	II	2	POS	SI	SI	06/2001	O	SI	
17	50,4	2,0	II	4	SI	POS	SI	07/2001	O	SI	
18	50,4	1,5	II	1	POS	POS	NEG	07/2001	SED	03/2015	164
19	59,4	2,5	II	3	SI	SI	SI	SI	SI		
20	55,1	2,4	III	3	POS	SI	SI	09/2001	O - m.h	05/2013	140
21	49,5	2,5	III	2	SI	SI	SI	SI			
22	95,3	2,0	II	4	POS	POS	NEG	11/2001	O	09/2003	22
23	82,4	2,0	II	2	POS	SI	NEG	01/2003	O	05/2007	52
24	63,2	4,0	III	2	NEG	NEG	POS	03/2003	O - c.ov	03/2010	84
25	64,0	5,0	SI	4	POS	POS	NEG	03/2003	O	04/2004	13
26	59,2	2,0	II	1	POS	POS	NEG	05/2003	SED	03/2015	142
27	69,0	3,5	SI	2	POS	SI	SI	08/2003	O - m.d	08/2004	12
28	54,0	7,0	III	3	NEG	SI	SI	08/2003	O	05/2005	21
29	51,6	4,0	I	2	SI	POS	NEG	09/2003	O	03/2014	126

30	40,5	1,7	II	SI	SI	SI	NEG	SI				
31	45,0	SI	SI	2	NEG	NEG	NEG	09/2003	VCD	03/2015	138	
32	72,6	3,5	III	2	NEG	NEG	POS	05/2004	O	08/2005	15	
33	71,2	3,5	II	4	POS	POS	POS	06/2004	O	SI		
34	53,4	7,0	II	4	POS	POS	NEG	06/2004	SED	03/2015	129	
35	44,7	3,5	III	3	POS	POS	NEG	08/2004	SED	03/2015	127	
36	55,9	2,0	II	SI	POS	POS	NEG	11/2004	UC - m.o	08/2012	93	
37	44,0	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI				
38	41,9	3,5	II	2	POS	POS	POS	06/2005	O	07/2011	73	
39	48,0	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI				
40	56,9	4,0	II	2	POS	POS	POS	12/2005	SED	03/2015	111	
41	39,7	4,5	II	2	POS	NEG	NEG	02/2006	SED	03/2015	109	
42	57,0	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI				
43	49,1	2,5	II	2	POS	SI	NEG	03/2006	SED	03/2015	108	
44	41,1	2,5	II	2	SI	POS	POS	03/2006	UC - m.d	08/2014	101	
45	47,6	5,0	III	2	SI	NEG	POS	03/2006	SED	03/2015	108	
46	34,6	5,0	SI	4	POS	NEG	NEG	04/2006	VCD - m.o	03/2015	107	
47	43,7	3,0	II	2	POS	NEG	POS	04/2006	O	07/2009	39	
48	43,0	2,5	I	2	POS	POS	NEG	06/2006	SED	03/2015	105	
49	74,0	2,0	III	SI	SI	SI	SI	SI				
50	36,3	5,5	III	4	NEG	NEG	POS	06/2006	UC - m.o	11/2010	53	
51	38,0	2,9	II	2	POS	POS	NEG	07/2006	UC - m.o	07/2014	96	
52	47,2	3,5	III	2	SI	SI	NEG	12/2006	O	SI		
53	51,6	3,5	I	3	POS	POS	NEG	01/2007	SED	03/2015	98	
54	65,0	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI				
55	89,1	3,5	III	2	POS	POS	SI	06/2007	SED	03/2015	84	
56	37,9	3,0	III	2	NEG	NEG	POS	07/2007	SED	03/2015	92	
57	45,9	5,7	III	SI	NEG	NEG	POS	07/2007	O - m.c	06/2008	11	
58	58,0	5,5	II	3	POS	POS	NEG	09/2007	O	WI		
59	52,1	9,0	III	3	NEG	POS	SI	12/2007	O - m.c	08/2005	85	
60	60,5	1,3	II	1	POS	POS	NEG	11/2007	SED	03/2015	88	
61	61,2	4,0	II	4	POS	POS	POS	12/2007	O	07/2012	55	

62	56,0	3,7	II	4	SI	SI	SI	SI				
63	56,0	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI				
64	72,0	3,5	II	2	POS	POS	SI	03/2010	SED	03/2015	60	
65	66,0	2,0	I	4	POS	POS	NEG	08/2009	SED	03/2015	67	
66	67,0	5,0	III	4	POS	POS	NEG	03/2010	SED	03/2015	60	
67	64,8	12,5	III	4	POS	POS	POS	07/2010	O	07/2012	24	
68	45,6	2,2	II	2	POS	POS	NEG	07/2010	SED	03/2015	56	
69	73,0	3,2	II	2	POS	POS	NEG	11/2010	SED	03/2015	52	
70	46,7	4,0	III	2	POS	POS	NEG	12/2010	SED	03/2015	51	
71	39,7	1,8	II	2	POS	POS	NEG	02/2011	SED	03/2015	49	
72	39,0	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI				
73	84,2	3,5	III	2	NEG	NEG	POS	05/2011	SED	03/2015	46	
74	39,3	1,2	III	1	NEG	NEG	NEG	08/2012	SED	03/2015	31	
75	44,1	6,5	III	3	SI	POS	NEG	10/2012	VCD - m.o	03/2015	29	
76	27,3	1,2	II	2	POS	NEG	POS	03/2013	SED	03/2015	24	
77	53,6	1,5	III	1	NEG	NEG	POS	01/2014	SED	03/2015	14	
78	44,5	1,8	II	1	POS	POS	SI	03/2014	SED	03/2015	12	
79	56,0	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI				
80	43,7	SI	II	SI	SI	SI	SI	03/2003	O	SI		
81	54,0	1,5	II	2	POS	SI	SI	07/2003	O	SI		
82	50,0	5,0	II	4	POS	SI	SI	11/2005	O	SI		
83	61,0	3,5	I	4	NEG	NEG	NEG	08/2008	SED	03/2015	79	
84	50,6	8,0	II	3	NEG	NEG	NEG	03/2012	SED	03/2015	36	

LN+: pacientes com metástases em linfonodos axilares, POS: positivo, NEG: negativo, NA: não analisado, SI: sem informação, DD: data do diagnóstico, OC: ocorrência, DOC: data da ocorrência, M: meses, O: óbito, UC: última consulta, SED: sem evidência de doença, VCD: viva com doença, m.c: metástase sistema nervoso central, m.d: metástases disseminadas, m.h: metástase hepática, m.o: metástase óssea, c.ov: câncer de ovário, c.p: carcinomatose peritoneal.

Apêndice 3: Informações de número de cópias de DNA das pacientes LN-.

Amostra	<i>FOSL1</i>	<i>GSTP1</i>	<i>NTSR1</i>	<i>FADD</i>	<i>CCND1</i>
1	normal	normal	normal	ganho	ganho
2	perda	normal	normal	ganho	ganho
3	perda	normal	ganho	NA	ganho
4	perda	ganho	ganho	NA	NA
5	NA	normal	normal	ganho	ganho
6	perda	normal	ganho	ganho	ganho
7	perda	normal	ganho	ganho	ganho
8	normal	ganho	ganho	ganho	ganho
9	perda	perda	ganho	normal	ganho
10	normal	normal	ganho	ganho	ganho
11	normal	normal	ganho	ganho	ganho
12	ganho	ganho	ganho	ganho	ganho
13	ganho	normal	normal	ganho	ganho
14	normal	normal	ganho	ganho	ganho
15	normal	normal	ganho	ganho	ganho
16	NA	NA	NA	NA	ganho
17	ganho	normal	ganho	ganho	NA
18	ganho	normal	normal	ganho	NA
19	perda	ganho	ganho	ganho	ganho
20	perda	ganho	ganho	ganho	ganho
21	normal	normal	ganho	ganho	ganho
22	normal	perda	normal	ganho	ganho
23	normal	normal	ganho	normal	ganho
24	ganho	normal	ganho	normal	ganho
25	normal	normal	ganho	ganho	ganho
26	normal	normal	ganho	ganho	ganho
27	perda	perda	ganho	ganho	ganho
28	perda	perda	ganho	normal	ganho
29	normal	normal	ganho	perda	ganho
30	normal	normal	ganho	normal	NA
31	ganho	normal	ganho	normal	ganho
32	normal	normal	ganho	perda	ganho
33	ganho	normal	ganho	normal	ganho
34	normal	normal	normal	perda	NA
35	ganho	ganho	ganho	ganho	ganho
36	normal	normal	ganho	ganho	ganho
37	ganho	ganho	ganho	ganho	NA
38	ganho	normal	ganho	ganho	ganho
39	ganho	normal	normal	normal	ganho
40	ganho	ganho	ganho	ganho	ganho
41	ganho	normal	ganho	ganho	NA
42	ganho	ganho	ganho	ganho	ganho
43	ganho	normal	ganho	normal	ganho
44	normal	normal	ganho	normal	normal
45	ganho	normal	ganho	normal	ganho
46	ganho	ganho	normal	NA	ganho
47	ganho	ganho	ganho	normal	ganho

48	ganho	ganho	ganho	normal	normal
49	ganho	normal	ganho	NA	normal
50	normal	normal	ganho	perda	normal
51	NA	normal	ganho	perda	normal
52	NA	NA	ganho	NA	ganho
53	NA	normal	ganho	normal	ganho

NA: não analisado.

Apêndice 4: Informações do número de cópias das pacientes LN+.

Amostra	FOSL1	GSTP1	NTSR1	FADD	CCND1
1	perda	normal	normal	NA	ganho
2	normal	perda	normal	NA	ganho
3	ganho	ganho	ganho	ganho	ganho
4	perda	perda	ganho	ganho	ganho
5	perda	normal	ganho	ganho	ganho
6	perda	normal	ganho	NA	ganho
7	normal	normal	ganho	ganho	ganho
8	normal	ganho	ganho	ganho	ganho
9	perda	normal	ganho	ganho	ganho
10	perda	perda	ganho	normal	NA
11	perda	ganho	ganho	ganho	ganho
12	perda	normal	ganho	perda	ganho
13	normal	normal	ganho	ganho	ganho
14	perda	normal	ganho	ganho	ganho
15	perda	normal	ganho	ganho	ganho
16	normal	normal	ganho	ganho	ganho
17	perda	ganho	ganho	ganho	ganho
18	perda	normal	ganho	normal	ganho
19	perda	normal	ganho	normal	NA
20	normal	normal	ganho	ganho	ganho
21	perda	ganho	ganho	ganho	ganho
22	normal	normal	ganho	ganho	NA
23	normal	normal	ganho	ganho	ganho
24	ganho	ganho	ganho	ganho	ganho
25	ganho	normal	ganho	ganho	ganho
26	perda	perda	ganho	normal	ganho
27	perda	normal	NA	ganho	ganho
28	ganho	ganho	ganho	ganho	ganho
29	ganho	normal	ganho	ganho	ganho
30	ganho	ganho	ganho	ganho	ganho
31	ganho	ganho	ganho	ganho	ganho
32	ganho	ganho	ganho	ganho	ganho
33	perda	perda	ganho	ganho	ganho
34	ganho	normal	ganho	ganho	NA
35	normal	normal	ganho	ganho	ganho
36	perda	normal	ganho	ganho	ganho
37	normal	normal	ganho	normal	ganho
38	normal	normal	ganho	ganho	normal
39	perda	normal	ganho	normal	ganho
40	perda	normal	ganho	ganho	NA
41	normal	ganho	ganho	ganho	ganho
42	perda	ganho	ganho	ganho	NA
43	perda	normal	normal	ganho	ganho
44	ganho	normal	normal	ganho	ganho
45	perda	normal	ganho	ganho	ganho
46	perda	normal	ganho	normal	ganho
47	normal	normal	normal	ganho	ganho

48	perda	normal	ganho	normal	ganho
49	normal	normal	normal	normal	ganho
50	perda	normal	ganho	normal	ganho
51	normal	normal	ganho	ganho	ganho
52	normal	normal	ganho	ganho	ganho
53	perda	normal	normal	NA	NA
54	perda	normal	ganho	ganho	ganho
55	normal	normal	ganho	ganho	ganho
56	perda	ganho	ganho	ganho	ganho
57	normal	normal	ganho	perda	ganho
58	ganho	normal	ganho	perda	ganho
59	ganho	ganho	ganho	normal	ganho
60	normal	normal	ganho	NA	ganho
61	ganho	ganho	ganho	normal	NA
62	ganho	normal	ganho	normal	ganho
63	normal	normal	ganho	normal	ganho
64	ganho	normal	ganho	ganho	ganho
65	ganho	ganho	ganho	ganho	ganho
66	ganho	ganho	ganho	ganho	ganho
67	normal	normal	normal	NA	ganho
68	normal	perda	normal	perda	ganho
69	normal	normal	ganho	normal	ganho
70	normal	normal	ganho	NA	normal
71	normal	ganho	ganho	ganho	ganho
72	ganho	normal	ganho	perda	ganho
73	ganho	normal	ganho	normal	normal
74	normal	ganho	ganho	normal	ganho
75	perda	perda	ganho	ganho	ganho
76	ganho	normal	normal	NA	ganho
77	NA	normal	NA	perda	ganho
78	NA	normal	ganho	normal	normal
79	normal	normal	ganho	normal	ganho
80	normal	normal	ganho	ganho	ganho
81	normal	normal	ganho	ganho	ganho
82	ganho	normal	ganho	normal	perda
83	normal	normal	ganho	perda	ganho
84	ganho	normal	ganho	perda	normal

NA: não analisado.

Apêndice 5: Caracterização das amostras LN- e LN+.

	LN- n (%)	LN+ n (%)
Tamanho tumor		
T1	21 (40,39)	18 (24,66)
T2	30 (57,69)	42 (57,53)
T3	1 (1,92)	13 (17,81)
Total	52	73
Grau tumor		
I	11 (21,57)	6 (8,33)
II	27 (52,94)	40 (55,56)
III	13 (25,49)	26 (36,11)
Total	51	72
Estágio tumor		
1	20 (40,00)	8 (11,76)
2	24 (48,00)	32 (47,06)
3	3 (6,00)	11 (16,18)
4	3 (6,00)	17 (25,00)
Total	50	68
RE		
+	34 (70,83)	40 (70,17)
-	8 (16,67)	17 (29,83)
Total	48	57
RP		
+	34 (77,27)	32 (62,74)
-	10 (22,73)	19 (37,26)
Total	44	51
ERBB2		
+	14 (34,15)	19 (38,00)
-	27 (65,85)	31 (62,00)
Total	41	50